Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Brüster)

BIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM REINHEITSGRAD VON ALBUMINKONZENTRATEN

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Dieter Sondag

1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0030

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Brüster)

BIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM REINHEITSGRAD VON ALBUMINKONZENTRATEN

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Dieter Sondag

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Trobisch

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Falke

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung bei meiner Arbeit danke ich Herrn Priv.Doz. Dr. med. Trobisch sehr herzlich.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Separation von Albumin aus Plasma	1
1.2.	Biochemische Daten des Humanalbumins	2
1.3.	Physikochemische Charakteristika des Humanalbumins	3
1.4.	Heterogenität	7
1.5.	Der Metabolismus des Humanalbumins	9
1.6.	Die Funktion des Humanalbumins	11
1.7.	Der klinische Einsatz von Humanalbuminkonzentraten	12
2.	MATERIAL	17
2.1.	Herkunft der Humanalbuminkonzentrate	17
2.2.	Reagenzien	18
3.	ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE METHODEN	22
3.1.1.	Bestimmung der Na-, K- und Ca-Konzentration	22
3.1.2.	Bestimmung der Chloridkonzentration	22
3.1.3.	Bestimmung der Glukosekonzentration	22
3.1.4.	Bestimmung der Osmolarität	23
3.1.5.	Bestimmung der hämolysierenden Wirkung der Humanalbuminkonzentrate	23
3.2.	Quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion (RID)	24
3.3.	Methoden zur Bestimmung der Gesamteiweiß-konzentration	25
3.3.1.	Messung der Absorption bei 28o nm	25
3.3.2.	Biuretmethode	25
3.4.	Methoden zur Bestimmung der Albuminkonzentration	26
3.4.1.	Bestimmung der Albuminkonzentration mit der Elektroimmundiffusion nach LAURELL	26
3.4.2.	Bestimmung der Albuminkonzentration mit Bromcresolgrün (BCG)	29
3.5.	Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese	31
3.6.	Die Laying-On-Methode	34
3.7.	Isoelectric-Focusing	36
3.7.1.	Präparatives Isoelectric-Focusing	37
3.7.2.	Dünnschicht-(Thin-Layer)-Isoelectric-Focusing	4o
3.8.	Gelchromatographie (Molekularsiebfiltration)	42

		Seite
4.	ERGEBNISSE	44
4.1.	Elektrolyt- und Glukosekonzentrationen, Osmolaritäts- und pH-Werte, hämolytische Wirkung der Humanalbuminkonzentrate	44
4.2.	Der Gesamtprotein-, der absolute und relative Albumingehalt der Humanalbuminkonzentrate	49
4.3.	Quantitative Bestimmung kontaminierender Proteine in Humanalbuminkonzentraten mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion	53
4.4.	Elektrophoretische Auftrennung der Humanalbuminkonzentrate mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese und immunologische Bestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Albuminkonzentrate mit der Laying-On-Methode	59
4.5.	Analytische isoelektrische Auftrennung der Albuminkonzentrate mit der Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik und Bestimmung der Albuminbanden mit der Laying-On-Methode	65
4.6.	Präparatives Isoelectric-Focusing der Humanalbuminkonzentrate	68
4.7.	Gelfiltrationsversuche	78
5.	DISKUSSION	84
6.	ZUSAMMENFASSUNG	99
7.	LITERATURVERZEICHNIS	1o3

1. EINLEITUNG

Der weltweite Mangel an Blut, als auch die Grundidee, eine "Hämotherapie nach Maß" durchzuführen, verlangen die Separation des Spenderblutes in Zellkonzentrate, gerinnungsaktive Plasmafraktionen, Immunglobuline und Albuminkonzentrate, damit jeder Patient nur jene Blutbestandteile erhält, die er auch wirklich benötigt (1,2).

1.1. Separation von Albumin aus Plasma

Basierend auf den Arbeiten von COHN und Mitarbeitern ist es möglich, Albumin in industriellem Maßstab durch eine Äthanol-Kältefraktionierung aus gepooltem Humanplasma herzustellen (3). Zahlreiche Modifikationen der Methode 6 von COHN sind bekannt geworden (4 - 1o). Weitere Präparationsmethoden sind:

Chromatographie:	CURLING et al. (11)
Ammoniumsulfat:	SCHULTZE et al. (12)
Ionenaustausch:	REID et al. (13)
Caprylat:	HOCH und CHANUTIN (14)
Trichloressigsäure:	MICHAEL (15)
Polyphosphat:	NITSCHMANN (16)
Hitze-Polyäthylenglykol:	SCHNEIDER et al. (17)

1.2. Biochemische Daten des Humanalbumins

Humanalbumin ist ein aus 584 Aminosäuren bestehendes Protein. Es enthält sowohl einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure) als auch basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin, Arginin). Hierdurch lassen sich die große elektrische Nettoladung, die hohe Polarität und die Affinität zu kleinen Molekülen (z.B. Fettsäuren) erklären. Der Gehalt an Cystin - bedingt durch 17 Disulfidbrücken pro Molekül - ist sehr hoch, der an Tryptophan, Methionin, Isoleucin und Glycin dagegen niedrig.

Das C-terminale Ende des Albuminmoleküls bilden die Aminosäuren Leu-Ala-Val-Gly (19), das N-terminale Ende Asp-Ala (2o). Die Sekundärstruktur des Albumins wird zu etwa 48% aus einer α-Helix, etwa 15% aus einer Faltblattstruktur und 37% aus einer "Random Coil" gebildet (21,22).
Humanalbumin weist einen Stickstoff-Gehalt von 16% auf. Der Aschegehalt beträgt zwischen o,o5 - o,1%. Der Lipidanteil liegt bei etwa o,2% (23). CHEN wies einen Fettsäuregehalt von 1,8 - 2,5 (o,8 - 1,1%) Mol pro Albuminmolekül nach und konnte den Fettsäureanteil auf weniger als o,oo4% durch Kohleadsorption senken (24).

Aminosäure	Anzahl der Aminosäuren pro Albuminmolekül
Asparaginsäure	39
Asparagin	15
Threonin	3o
Serin	22
Glutaminsäure	6o
Glutamin	23
Prolin	25
Glycin	12
Alanin	63
Cystin/2 +	34
Cystein	1
Valin	39
Methionin	6
Isoleucin	8
Leucin	61
Tyrosin	18
Phenylalanin	3o
Histidin	16
Lysin	58
Tryptophan	1
Arginin	23
	584

+ Der Cystingehalt wird durch den mit dem Cystein äquivalenten "Halbcystinwert" ausgedrückt. Zwei Halbcystine entsprechen einer Disulfidbrücke.

Tab.I: Aminosäurenzusammensetzung von Humanalbumin (18,54)

Die Fettsäuren, die an die positiv geladenen Gruppen des Albumins gebunden werden, stabilisieren die Albumintertiärstruktur und schützen das Molekül vor Denaturierungsvorgängen.

Der Kohlenhydratgehalt ist o,o8% (23). Die Abwesenheit von Kohlenhydrat ist ein klassisches Kriterium der Reinheit von Albumin (26). Der Metallgehalt liegt bei etwa o,o2% (27).

In Lösung befindliches Albumin ist farblos. Wird Albumin aus hämolysiertem Blut gewonnen, so können diese Präparate eine gelbliche Farbe annehmen, die durch Hämatin bedingt ist. Eine Entfernung des Hämatins ist sehr schwierig (28). Selbst in reinen Albuminpräparaten sind enzymatische Aktivitäten nachgewiesen worden, wie z.B. Esterasen (29), Proteasen (3o), Nucleasen (31), Phospholipasen (32).

Neben den 17 Disulfidverbindungen im Albuminmolekül befindet sich in Position 34 ein Sulfhydrylrest ($CySH_{34}$). Etwa zwei Drittel eines Albuminpräparates weisen eine meßbare Thiolgruppe (Mercaptoform) auf. Diese Beobachtung wurde von HUGHES und DINTZIS (33,34) gemacht. Sie isolierten die Thiolform mittels Dimerisation mit Quecksilber (II). Entfernen des Hg-Ions durch Reduktion erbrachte "Mercaptalbumin", welches 1 SH pro Molekül besitzt, im Gegensatz zu o,67 SH pro Molekül im unfraktionierten Albumin.

Der Thiolgehalt des Albumins steigt von o,67 auf o,1 bei milder Reduktion mit Thioglykolat in einem pH-Bereich zwischen 5 bis 7 (35). Unter diesen Bedingungen öffnen sich keine inneren Disulfidbindungen. Offenbar sind die Sulfhydrylgruppen im "Non-Mercaptalbumin" durch Substanzen blockiert oder stehen unter einem stereochemischen Schutz.
Unter alkalischen Bedingungen reagiert die Sulfhydrylgruppe mit L-Cystein oder L-Cystin und bildet gemischte Disulfide (36). Bei pH 7,4 findet eine vollständige Reaktion in 2o Stunden bei 37°C mit einem 5-fachen Mol-Überschuß von L-Cystin statt. Die Reaktion verläuft über Thiol-Disulfidaustausch mit nachfolgender Reoxidation des neugebildeten freien Cysteins zu der Disulfidform.

1.3. Physikochemische Charakteristika des Humanalbumins

Die wichtigsten physikochemischen Eigenschaften des Humanalbumins gibt die Tab.II wieder.

Eigenschaft	Wert	Autor
Molekularmasse (in Daltons)	65.000	25
Sedimentationskonstante $S_{20,w} \times 10^{13}$		37
Monomer	4,6	
Dimer	5,6	
Diffusionskonstante $D_{20,w} \times 10^{7}$	6,1	37
Innere Viskosität, η	0,042	37
Reibungsverhältnis f/f_o	1,28	37
Größe Å	38x150	25
Isoelektrischer Punkt		
$\Gamma/2=0,15$	4,7	25
$\Gamma/2=0,0$ entfettet	5,2	25
Isoionischer Punkt $\Gamma/2=0$	5,2	25
Elektrophoretische Mobilität pH 8,6 $\Gamma/2=0,1$	-5,9	38
Extinktion $A^{1g/l}_{279\ nm}$	0,531	25
Nettoladung pro Molekül pH 7,4	-19	39

Tab.II: Physikochemische Eigenschaften des Albumins.

1.4. Heterogenität

Albumin stellt sich bei biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen nicht als ein homogenes, sondern mehr als ein aus mehreren Komponenten bestehendes Molekül dar. FOSTER wandte den Terminus "Mikroheterogenität", der von COLVIN eingeführt wurde, auf dieses Phänomen an (4o). Die Ursachen dieser Mikroheterogenität lassen sich wie folgt erklären:

1. Auf genetische Varianten.

2. Auf möglicherweise "molecular aging".
   Dieser Ausdruck von WONG und FOSTER beinhaltet die Veränderung von Aminosäureeinheiten, ohne daß eine Trennung von Peptidbindungen oder größeren konformationellen Veränderungen eintritt (41). So nimmt bei Lagerung von Albumin der SH-Gehalt ab (42).

3. Ebenfalls können tertiäre konformationale Änderungen eine Mikroheterogenität bewirken (43). GUTTER fand in einer 3 - 5 molaren Karbamidlösung Differenzen in der Sedimentationsgeschwindigkeit und schrieb dies tertiären Umlagerungen zu, welche auf elektrostatischen oder Wasserstoffbindungen beruhte (44).

4. Anionen, wie Fettsäuren (45,46,47), Penicillin (48) und Puffersalze (47,49,5o) verursachen das Auftreten von verschiedenen elektrophoretischen Peaks. FOSTER (21,22) führte das Auftreten verschiedener elektrophoretischer Peaks von Albumin in dem pH-Bereich von 3 bis 4 zurück auf einen Übergang von einer normalen oder N-Form zu einer elektrophoretisch schneller wandernden oder F-Form, welche eine Zwischenform vor der Säureausdehnung darstellt (N-F-Isomerisation): $N + 3\ H^{+} \rightleftharpoons F$.
Dieser Vorgang geschieht sehr schnell und ist reversibel. Die F-Form ist isoliert worden und zeichnet sich z.B. durch ihre Unlöslichkeit in starken Salzlösungen aus.

5. Die Isolation von Disulfiddimeren und Albuminpolymeren gelang chromatographisch auf Diäthylaminomethyl Zellulose (51), Diäthylaminoäthyl Sephadex (52) und auf Sepahdex (53). In der Aminosäurenzusammensetzung wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (54). Der Dimeranteil beträgt in frischen Präparaten ca. 5%, in älteren Präparaten steigt dieser Anteil an (55). Mittels Filterpapier- und Stärkegelimmunelektrophorese wurde bei 5o - 6o% gesunder Probanden ein geringer Anteil Albuminpolymere in vivo gefunden (56).

1.5. Der Metabolismus des Humanalbumins

Der Albumingehalt des Normalhumanserums beträgt 42±3,5 g/l (57,58). Das entspricht einem Prozentgehalt von 6o±4% vom Gesamtprotein (58).
Albumin wird fast ausschließlich im Leberparenchym (o,4 mg Albumin/g Leber/die) synthetisiert, geringe Mengen auch in Organen entodermalen Ursprungs.
Die Halbwertszeit des zirkulierenden Albumins beträgt 19 Tage, gemessen mit 131^{J}-markiertem Albumin (57).
Täglich werden etwa 14 g Albumin abgebaut.
Die Regulation der Albuminsynthese geschieht über drei Faktoren:

1. Plasmaalbuminspiegel oder den kolloidosmotischen Druck (61), wobei ein Rezeptormodell im Leberinterstitium angenommen wird.

2. Hormonell (62). OWEN z.B. wies eine Albuminsynthesesteigerung durch Testosteron nach.

3. Proteinzufuhr (62,63).

Organ	g/7o kg Körpergewicht	Konzentration g/kg Organ
Blut	14o g	24,o g
Extravaskulärer Raum	21o g	
Muskulatur	5o g	2,3 g
Haut	4o g	7,7 g
Leber	2 g	1,4 g
Darm	8 g	5,o g
sonstiges Gewebe	11o g	
Absolutgehalt	35o g	

Tab.III: Intra- und extravaskuläre Verteilung von Albumin (18,59,6o).

1.6. Die Funktion des Humanalbumins

In der Erhaltung der Homöostase erfüllt das Albumin eine Vielzahl von Aufgaben: Regulation des kolloidosmotischen Druckes, Transportfunktion, Pufferung und Ernährung. Der kolloidosmotische Druck des Blutes wird zu 80% vom Albumin erzeugt. Durch den Transport von freien Fett- und Gallensäuren greift Albumin in den Fettstoffwechsel im Sinne einer Transport- und Klärfunktion ein. Der Transport des Bilirubins ist nicht nur in der Neugeborenenperiode eine wichtige Funktion, sondern Albumin dient vielen Pharmaka, wie Antibiotika, Sulfonamiden, Salizylaten, Barbituraten, Cumarinderivaten und vielen anderen als Vehikel. Durch Transport und Bindung von Metallen (Ca^{++}, Cu^{++}), Aminosäuren (Tryptophan) und Hormonen wirkt das Albumin auch als Puffer und garantiert eine stabile Plasmakonzentration dieser Substanzen. Als Ampholyt übernimmt das Albumin auch eine wichtige Aufgabe im Säure-Basen-Haushalt. Am Eiweißstoffwechsel ist es etwa zu 10% beteiligt, in dem es als Aminosäurenreservoir dient.

1.7. Der klinische Einsatz von Humanalbuminkonzentraten

THEODORE PETERS,Jr., schrieb: "The concentration of albumin in the circulation is a measure of health, or, to say it another way, happiness is a normal albumin level."

1.7.1. Die Indikation zur intravenösen Applikation von Albumin liegt primär bei Volumenmangel und Hypoproteinämien. P.LUNDSGAARD-HANSEN faßt die Indikationen zur Albumintherapie wie folgt zusammen (64):

Akute Indikationen, in denen Albumin prinzipiell indiziert ist:

- Blutverlust,
- Verbrennungen,
- generalisierte exfoliative Dermatitis (Lyell-Syndrom),
- akutes Lungenversagen (Adult respiratory distress Syndrom),
- extrakorporaler Kreislauf.

Akute Indikationen, in denen Albumin u.U. indiziert ist:

- Prä- und postoperative Hypoproteinämie,

- "Dritte Räume" (Sequestrierung eiweißreicher Flüssigkeit) infektiöser Genese,
- perakutes Leberversagen,
- akute Nephrose,
- Aszitespunktion,
- Hämodialyse,
- Suspensionsmittel für gewaschene Erythrozyten.

Indikationen, welche weiterer Klärung bedürfen:

- Die therapeutische Plasmapherese bzw. Plasmaaustausch mit Albuminersatz beim Goodpasture-Syndrom, generalisiertem L.E. und Intoxikationen mit proteingebundenen Medikamenten.

Indikationen, welche die Zufuhr von Albumin primär nicht rechtfertigen:

- Stabilisierte Hypoproteinämie bei Unterernährung,
- chronische Leberzirrhose,
- chronische Nephrose,
- proteinverlierende Enteropathie,
- Malabsorption,
- chronische Pankreasinsuffizienz.

Die Anwendung von Albumin zur parenteralen Ernährung ist wegen seines langsamen Abbaues und des, für die Synthese anderer Proteine ungünstigen Aminosäuregehaltes grundsätzlich nicht indiziert.
Entsprechend den obengenannten Indikationen sind ein 5 %iges isotones, zur Volumensubstitution mit langzeitiger Stabilisierung des kolloidosmotischen Druckes und ein 2o%iges hyperonkotisches Albuminkonzentrat zur Normalisierung des kolloidosmotischen Druckes bei Hypoproteinämien im Einsatz. Der Albuminreinheitsgrad dieser Konzentrate wird mit 9o% angegeben.

1.7.2. Kontraindikationen:

Eine absolute Kontraindikation - abgesehen von Unverträglichkeit gegen Humanalbumin - ist nicht bekannt. Relative Kontraindikationen ergeben sich z.B. bei dekomp. Herzvitien, Hypertonie, Ösophagusvarizen, hämorrhagischen Diathesen, renalen und postrenalen Anurien und protrahiertem Schock wegen des durch die Albuminzufuhr erzeugten Blutdruckanstiegs und der Erhöhung des Schlagvolumens des Herzens.

1.7.3. Unverträglichkeiten:

Die Häufigkeit schwerer Unverträglichkeiten wird mit 1 auf 3o.ooo verabreichten Einheiten angegeben (65). Gelegentlich können - wie bei allen volumenwirksamen Lösungen - leichte Unverträglichkeiten: flüchtige, urtikarielle Hautreaktionen, vorübergehende Hypotension, Temperaturanstieg und/oder Schüttelfrost auftreten.

Das Infektionsrisiko, besonders das der Hepatitis, wird durch drei Maßnahmen gering gehalten:

1. Die Blutspender stehen unter laufender ärztlicher Kontrolle.
2. Durch Laboruntersuchungen, z.B. Test auf HBsAG.
3. Durch Erhitzen der Albuminkonzentrate in Gegenwart von Natrium-Acetyl-Tryptophanat und Natrium-Caprylat 1o Stunden auf 6o^{o}C werden potentiell vorhandene Erreger abgetötet (66).

Da die Albuminkonzentrate frei von Isoagglutininen des ABO-Systems sind, können Inkompatibilitäten mit den Empfängererythrozyten nicht auftreten.

1.7.4. Leistungsgrenzen der Humanalbumintherapie:

Beim Einsatz größerer Mengen von Albuminkonzentraten müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden:

Albumin transportiert fast keinen Sauerstoff, und den Albuminkonzentraten fehlen jegliche Gerinnungsaktivitäten.

Aufgabe der vorliegenden Dissertation soll es sein, im Handel befindliche Humanalbuminkonzentrate verschiedener Hersteller miteinander zu vergleichen in Hinblick auf Albumin-, Elektrolyt- und Glukosegehalt, Osmolarität, pH-Wert, Hämolysewirkung und Kontamination mit anderen Proteinen.
Besonderes Schwergewicht wird auf den gelchromatischen, elektrophoretischen und immunologischen Nachweis von Albuminoligomeren bzw. der Albuminheterogenität in den Albuminkonzentraten gelegt. Weiter soll die isoelektrische Albuminheterogenität in den Albuminkonzentraten dargestellt werden.

2. MATERIAL

2.1. Herkunft der Humanalbuminkonzentrate

Proben-Nr.	Hersteller	eingetr.Markenname	Albumin-gehalt	Chargen-Nr.
1+	Cutter	Plasma-Protein-Frakt.	5%	M 6005
2	Intersero	Albumin human	5%	Lot 76/25
3	Travenol	Human-Albumin	5%	2209-76-101
4	Biotest	Humanalbumin	5%	356106
5+	Schura	Serumeiweiß-Konserve	5%	325053
6	DRK-Hagen	Humanalbumin	5%	190177
7	DRK-Münster	Humanalbumin	5%	30159
8	Immuno	Human Albumin	5%	0103877
9	Behring	Humanalbumin	5%	CH-B 443159
10	Kabi	(ein 5% Konzentrat war 1978 nicht im Handel)		
11+	Cutter	Normal-Serum-Albumin	25%	M 5998
12	Intersero	Albumin human	20%	Lot 700563
13	Travenol	Humanalbumin	20%	13067 7-A01
13a	Travenol	Humanalbumin	20%	78041 3AA11A
14	Biotest	Humanalbumin	20%	30637
15	Schura	Albumin human	20%	60253
16	DRK-Hagen	Humanalbumin	20%	60250
17	DRK-Münster	Humanalbumin	20%	60256
18	Immuno	Humanalbumin	20%	0103777
19	Kabi	Humanalbumin	20%	704533454
20	Rhodia Pharma	Humanalbumin	20%	PL 77 A 17
21	Behring	Humanalbumin	20%	CH-B 44097

+Bei diesen Produkten handelt es sich um PPL-Präparate.

2.2. Reagenzien:

Alle aufgeführten Reagenzien waren von p.a. Qualität.

Calciumlactat (Merck, Darmstadt)
Barbitursäure (Merck, Darmstadt)
Tris (Hydroxylmethylaminomethan) (Merck, Darmstadt)
Natriumazid (Merck, Darmstadt)
Bernsteinsäure (Merck, Darmstadt)
Eisessig (Merck, Darmstadt)
Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
Sulphosalicylsäure (Merck, Darmstadt)
Essigsäure (Merck, Darmstadt)
Äthanol (Merck, Darmstadt)
Methanol (Merck, Darmstadt)
Saccharose (Merck, Darmstadt)
Glyzerin (Merck, Darmstadt)
Äthylenglykol (Merck, Darmstadt)
Merkotest^{R}: Chlorid (Merck, Darmstadt)
Biuret-Reagenz (Merck, Darmstadt)
Bromcresolgrün (Merck, Darmstadt)
Test-Combination Gluco-quant (Boehringer, Mannheim)
Brij 35 (Serva, Heidelberg)
Agarose C (Pharmacia, Freiburg)
Polyacrylamid-Gradienten-Flachgele (Pharmacia, Freiburg)
Elektrophoreses Calibration Kit (Pharmacia, Freiburg)
Coomassie Brilliant Blue R (E. Gurr Ltd., Searle Diagnostic, High Wycombe, Bucks, U.K.)
Biogel P 2oo (Bio-Rad, München)
Humanalbumin lyoph., reinst (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Partigen^{R}-Platten (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

Anti-Humanalbumin-Serum v. Kan. (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Anti-Humanalbumin-Serum v. Ziege (Oxford Laboratories, München)
Anti-Humanalbumin-Serum v. Kan. (Medac, München)
Ampholine PAGplate^{R} (LKB-Producter AB, Bromma, Schweden)
Ampholyte: Ampholine^{R} (LKB-Producter AB, Bromma, Schweden)

Tris-Barbitursäure-Calciumlactat-Puffer, pH 8,6:

28 g Barbitursäure
55,4 g Tris
0,7 g Calciumlactat
0,8 g Natriumazid

gelöst in 5 l dest. steril. Wasser

Lösung zur Fixierung und Färbung von Polyacrylamid-Gradienten-Flachgele:

Fixierer:

57 g	Trichloressigsäure
17 g	Sulphosalicylsäure
150 ml	Methanol
350 ml	dest. Wasser
500 ml	

Färber:

2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R
450 ml	Methanol
450 ml	dest. Wasser
100 ml	Glyzerin
1.000 ml	

Entfärber:	6oo ml	Äthanol
	2oo ml	Essigsäure
	1.2oo ml	dest. Wasser
	2.ooo ml	

Konservierer:	3oo ml	Äthanol
	1oo ml	Essigsäure
	1oo ml	Glyzerin
	5oo ml	dest. Wasser
	1.ooo ml	

Lösungen für die Färbung und Entfärbung von Agarose-Platten der Laying-On-Methode und der immunologischen Albuminbestimmung nach LAURELL:

Färber:	5o g	Coomassie Brilliant Blue R
	1o l	Entfärberlösung

Entfärber:	4,5 l	Äthanol
	4,5 l	dest. Wasser
	1,o l	Eisessig
	1o,o l	

Lösung für Thin-Layer-Isoelectric-Focussing:

Fixierer:	57,5 g	Trichloressigsäure
	17,3 g	Sulphosalicylsäure
	5oo,o ml	dest. Wasser
	5oo,o ml	

Färber:	0,46 g	Coomassie Brilliant Blue R
	400 ml	Entfärberlösung
Entfärber:	500 ml	Äthanol
	160 ml	Essigsäure
	1.340 ml	dest. Wasser
	2.000 ml	
Konservierer:	40 ml	Glyzerin
	400 ml	Entfärberlösung
	440 ml	

3. ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE METHODEN

3.1.1. Bestimmung der Na-, K- und Ca-Konzentration

Die quantitative Bestimmung dieser Elektrolyte erfolgte mittels des Eppendorf-Flammenphotometers FCM 6341.

3.1.2. Bestimmung der Chloridkonzentration

Die quantitative Chloridbestimmung erfolgte titrimetrisch. Bei der merkurimetrischen Chloridtitration reagieren die vorhandenen Cl^--Ionen mit den Hg^{++}-Ionen der Messlösung zu undissoziiertem Quecksilber(II)-chlorid. Erst nach Bindung aller Cl^--Ionen treten freie Hg^{++}-Ionen auf. Mit diesen überschüssigen Hg^{++}-Ionen reagiert der Indikator Diphenylcarbazon, und es entsteht eine violette Färbung.
Es wurde der gebrauchsfertige Reagenziensatz der Fa. Merck, Darmstadt verwendet.

3.1.3. Bestimmung der Glukosekonzentration

Glukose wurde enzymatisch mit der Hexokinasemethode quantitativ bestimmt.

Prinzip:

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Hexokinase}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G-6PDH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^{+}$$

Die gebildete Menge NADPH, die aus der Extinktionszunahme bei 365 nm berechnet wird, entspricht stöchiometrisch der umgesetzten Glukosemenge.
Es wurde der gebrauchsfertige Reagenziensatz der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet.

3.1.4. Bestimmung der Osmolarität

Die Osmolaritätsbestimmung erfolgte auf dem Halbmikro-Osmometer der Fa. Knauer.

3.1.5. Bestimmung der hämolysierenden Wirkung der Humanalbuminkonzentrate

Hämoglobin, das aus Erythrozyten ausgetreten ist, läßt sich in geringsten Spuren spektralphotometrisch nachweisen.
Erythrozyten der Blutgruppe O positiv werden von allen Serumbestandteilen durch 3-maliges Waschen befreit.

Nach Resuspension der Erythrozyten in isotonischer NaCl wird eine definierte Menge Humanalbuminlösung zugesetzt und die Mischungen o,5, 1, 2, 4 und 8 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Eine etwaige auftretende Hämolyse wird nach Sedimentation der Erythrozyten spektralphotometrisch im Überstand nachgewiesen.

3.2. Quantitative Proteinbestimmung mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion (RID) (67)

Das Protein wird in eine runde Auftragsstelle eingetragen, die in eine antikörperhaltige Gelschicht gestanzt ist. Die Flächenvergrößerung des Präzipitatsrings stellt eine Funktion der Quadratwurzel der Zeit dar. Von Beginn der Diffusion des Antigens an bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex. Am Endpunkt der Diffusion ist die Fläche des Präzipitatringes der Proteinkonzentration direkt proportional.
Zur Bestimmung verwendete man das Partigen^{R}-Sortiment der Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

3.3. Methoden zur Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration

3.3.1. Messung der Absorption bei 28o nm

Die Lichtabsorption der Proteine bei 28o nm ist durch deren Gehalt an aromatischen Aminosäuren bedingt und kann als Maß für die Konzentration benutzt werden.

3.3.2. Biuretmethode

Diese Reaktion basiert auf der Anlagerung von Kupferionen im alkalischen pH-Bereich an die Peptidbindungen der Proteine. Die Intensität der entstehenden violetten Farbe ist der Proteinkonzentration proportional und wird photometrisch bei 545 nm gemessen. Im Biuretreagens wird das zweiwertige Kupfer im alkalischen Milieu durch Tartratkomplex in Lösung gehalten.
Als Eichsubstanz wurde lyophilisiertes Humanalbumin der Behringwerke AG, Marburg/Lahn, verwendet.
Alle Bestimmungen erfolgten mit dem Spektralphotometer Modell 25 der Firma Beckmann.

3.4. Methoden zur Bestimmung der Albuminkonzentration

3.4.1. Bestimmung der Albuminkonzentration mit der Elektroimmundiffusion nach LAURELL (68)

Prinzip:

Ein Anti-Humanalbuminserum wird homogen in ein Agarosegel inkorporiert. An der kathodenwärts gelegenen Seite des Gels werden runde Auftragsstellen gestanzt, in denen unter Stromfluß in der Elektrophoresekammer die zu untersuchenden Albuminproben einpipettiert werden. Das Albumin wandert anodenwärts. Der Albumin-Antialbumin-Komplex präzipitiert, sobald der Äquivalenzpunkt zwischen Antigen und Antikörper erreicht wird. Die Länge der raketenförmigen Präzipitate ist in gewissen Bereichen proportional der aufgetragenen Albuminmenge. Durch Mitführen einer Standard-Albuminlösung in geometrischer Verdünnungsreihe erhält man eine Eichkurve, in der man die Peaklängen den Albuminkonzentrationen zuordnet.

Methode und Durchführung:

Zur Herstellung einer Agarosegelplatte erhitzt man 1,5 g Agarose in 1oo ml Tris-Barbitursäure-Calciumlactat-Puffer, pH 8,6, bis zum Sieden. Das Anti-Humanalbuminserum wird erst dann dem flüssigen Sol zugesetzt, wenn das Agarose-

gel im Wasserbad auf 56°C abgekühlt wurde. Je nach Titer werden 1 bis 3% (v/v) Anti-Humanalbuminserum dem Agarosegel zugesetzt. Aus zwei entfetteten 1ox1o cm Glasplatten wird mittels eines U-Rahmens und Bulldogklemmen ein Trog hergestellt. Zwischen den Glasplatten ist ein Abstand von ca. 1,5 mm. Es werden ca. 15 ml Anti-Humanalbumin-haltige Agarose luftblasenfrei in den Trog pipettiert. Nach 2o Minuten werden die Bulldogklemmen, der U-Rahmen und die oberste Glasplatte vorsichtig entfernt. Die Gelkanten werden begradigt. Mittels einer Stanzkanüle und einer Stanzschablone werden Auftragsstellen mit einem Durchmesser von 2,5 mm in die Gelschicht gestanzt. Die Gelplatte wird sofort auf den Kühltisch der Elektrophoresekammer gelegt, wobei die Auftragsstellen kathodenwärts liegen. Durch Filterpapier, das in Puffer getränkt wurde, wird der Kontakt zwischen Puffertrog und dem Gel hergestellt. Unter Stromfluß werden 5 ul der Proben mittels einer Hamilton-Mikropipette aufgetragen.
Als Standard dient ein lyophilisiertes Humanalbumin der Behringwerke AG, Marburg/Lahn, das in dem Elektrophoresepuffer in folgenden Verdünnungen hergestellt und tiefgefroren aufbewahrt wird:

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	Verdünnung
o,5	o,25	o,125	o,o62	o,o31	mg/ml Albumin

Es wird mit einer Feldstärke von 1o V/cm drei Stunden lang getrennt. Die Kühlung bei 15°C wird durch einen Umlaufthermostaten gewährleistet. Kondenswasserbildung auf der Geloberfläche führt zu verwaschenen Präzipitaten und läßt sich vermeiden, indem der Deckel des Schutzbehälters nur locker aufliegt, evtl. Luftspalt freilassen.
Nach der Elektrophorese werden die Agaroseplatten von dem Kühltisch genommen, mit zwei Lagen Filterpapier abgedeckt und unter einem Fön getrocknet. Danach werden die nicht präzipitierten Proteine sowie Salze durch 15-minütiges Waschen in isotoner Kochsalzlösung und 2x15-minütiges Waschen in destilliertem Wasser entfernt. Die getrockneten Gele werden max. 3o Minuten in der Coomassie-Brilliant-Blue-R-Lösung gefärbt. Das Auswaschen überschüssigen Farbstoffs erfolgt in einer Entfärberlösung. Anschließend durchläuft die Platte ein Bad mit abs. Äthanol. Nach erneuter Trocknung wird die Gelplatte mit der Gelseite auf ein Millimeterpapier gelegt und die Peaklänge vom oberen Rand der Auftragsstelle bis zur Peakspitze gemessen. Die Berechnung der linearen Regression erfolgt auf einem Hewlett-Pakard-Tischrechner, Modell 983o A. Dabei werden die Peaklängen des Standards als Ordinaten-,

die Konzentration in mg/ml als Abszissen-Werte angegeben. Nach Errechnung des Korrelationskoeffizienten und Kalkulation des Ordinatenabschnitts und der Steigung werden die Peaklängen der Proben eingegeben. Je nachdem ob verdünnt worden ist, muß noch mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Ergeben sich Peaklängen, die außerhalb der Eichkurve liegen, müssen die Proben in verdünnter oder konzentrierter Form noch einmal analysiert werden.

3.4.2. Bestimmung der Albuminkonzentration mit Bromcresolgrün (BCG) (69)

Prinzip:

Albumin bildet mit dem Farbstoff Bromcresolgrün eine farbige Verbindung, die bei der Wellenlänge von 628 nm spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

Methode und Durchführung:

Folgende Lösungen sind herzustellen:

(A) Bernsteinsäure-Puffer, o,1 mol, pH 4,o:

11,9 g Bernsteinsäure werden in 8oo ml dest. Wasser gelöst, mit 1 mol NaOH auf pH 4,o eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

(B) Bromcresolgrünlösung, o,6 mmol:

419 mg BCG werden in 1o ml o,1 mol NaOH gelöst und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

(C) Brij-35-Lösung, 3o%:

Brij 35 wird in dest. Wasser unter Wärmezufuhr gelöst.

(D) Arbeitslösung:

75o ml Bernsteinsäure-Puffer (A) und 25o ml Bromcresolgrünlösung (B) werden gemischt, 4 ml 3o%iges Brij 35 (C) zugesetzt und vorsichtig auf pH 4,2o±o,o5 eingestellt.

Alle Lösungen sind bei 4°C zu lagern.

Als Standard dient ein lyophilisiertes Humanalbumin, das in physiologischer Kochsalzlösung wie folgt verdünnt wird:

5o,o g/l 25,o g/l 12,5 g/l

Zu der 5 ml Arbeitslösung (D) werden 25 ul der Probe zugesetzt, gemischt und 1o Minuten bei 25°C inkubiert. Die Messungen erfolgen spektralphotometrisch bei 628 nm.

Eichkurve:

Die Konzentrationen des Standards werden auf der Ordi-

nate aufgeführt, die korrespondierenden Extinktionen auf der Abszisse. Die gemessenen Extinktionen der Proben können aus der Eichkurve direkt oder über einen Faktor (Steigung der Eichkurve) ermittelt werden. Sind Extinktionen kleiner als der kleinste Standardwert oder größer als der größte Standardwert, so werden die Proben konzentriert oder verdünnt erneut analysiert.

3.5. Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese (7o-73)

Prinzip:

Ein Proteingemisch wird auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Anode hin steigt die Polyacrylamidkonzentration an, die Porengröße wird kleiner. Wird nun eine elektrische Spannung angelegt, so wandert das als Anion vorliegende Protein zur Anode. Das Protein ergibt an der Stelle des Polyacrylamidgels eine scharfe Bande, an der die Porengröße des Gels gleich der Größe des Proteinmoleküls ist. Je kleiner ein Proteinmolekül ist, desto weiter wandert es von der Kathode fort. Verhalten sich Molekülvolumen und Molekülmasse etwa proportional, so lassen sich Rückschlüsse auf die Molekularmasse ziehen.

Methode und Durchführung:

Die Elektrophorese wird mit einem Gerät der Firma Pharmacia, Freiburg, durchgeführt. Vier Polyacrylamid-Gradienten-Flachgelplatten in hängender Anordnung können gleichzeitig gefahren werden. Als Puffer dient ein Tris-Barbitursäure-Calciumlactat-Puffer, pH 8,6. Zuerst werden die Polyacrylamid-Gradienten-Platten 12 bis 16 Stunden bei 1oo V konstant mit dem Puffer äquilibriert. Danach wird ein Auftraggeber in den Plattentrog vorsichtig auf das Gel gesetzt, vorhandene Luftblasen werden entfernt. Der Auftraggeber besitzt 12 Auftragsstellen. Die äußeren Auftragsstellen werden möglichst nicht benutzt. Das Markerproteingemisch läuft jeweils im mittleren Gelbereich und kann je nach Auftragsstelle zur Kennzeichnung der Gelplatte dienen. Die Proben erhalten zur Dichteerhöhung etwas kristalline Saccharose, um eine Konvektion während des Auftragens zu vermeiden, und damit sich eine gleichmäßige Proteinbande auf dem Gel bilden kann. Es werden 7 ul der jeweiligen Probe mittels einer Hamilton-Mikropipette aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen sollten etwa 5o mg/ml betragen. Damit die Proteine gleichmäßig in das Gel eindringen, wird eine Vorelektrophorese mit 7o V für 2o Minuten gefahren. Danach erfolgt die Auftrennung

bei 1oo V und 15 Stunden. Nach beendeter Elektrophorese werden die Platten aus der Elektrophoresekammer entfernt, das Gel von den Glasplatten befreit und für zwei Stunden in eine Fixiererlösung gelegt. Anschließend erfolgt eine 2-stündige Färbung in einer Coomassie-Brilliant-Blue-R-Lösung. Das Entfärben geschieht über Nacht. Es wird so weit entfärbt, bis das Gel durchsichtig und die am schwächsten gefärbten Proteinbanden noch zu erkennen sind. Die fertigen Gele werden photographisch dokumentiert und eventuell in einer Konservierungslösung aufbewahrt.

Bestimmung der Molekularmasse:

Wenn die getrennten Proteine ein ähnliches elektrophoretisches Verhalten und eine Molekülform besitzen wie die Markerproteine, können die Molekularmassen bestimmt werden.

Zur Aufstellung einer Eichkurve werden die "relativen Wanderungsentfernungen" der einzelnen Markerproteine

$$R_f = \frac{\text{Entfernung der Proteinbande von der Auftragsstelle}}{\text{Gesamtlänge der Polyacrylamid-Gelplatte}}$$

ermittelt. Auf halblogarithmischem Millimeterpapier werden die Molekularmassen der Markerproteine auf der Abszisse in log. Maßstab aufgetragen, die korrespondierenden R_f-Werte auf der Ordinate aufgeführt. Werden die R_f-Werte der Proteine ermittelt, so lassen sich aus der Eichkurve deren Molekularmassen bestimmen.

3.6. Die Laying-On-Methode

Die Laying-On-Methode oder die zweidimensionale Immunelektrophorese geht im Prinzip auf RESSLER (74) zurück, wurde von LAURELL modifiziert (75) und von CLARKE und FREEMAN (76) zu einem quantitativen Verfahren ausgebaut.

Prinzip:

Die Laying-On-Methode kann als Kombination der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese (s. 3.5.) mit der Elektroimmundiffusion (s. 3.4.1.) angesehen werden.

Methode und Durchführung:

In der 1. Elektrophorese werden die Proteine mittels der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese aufgetrennt. Pro Platte werden zwei Proteingemische getrennt. Das Auftragsvolumen beträgt jeweils 7 ul, bei einem Proteingehalt von 5o mg/ml. In den 12 zur Verfügung stehenden Auftragsstellen werden in Position 2 und 8 das Protein A, in Position 4 und 1o das Protein B aufgetragen. In Position 6 läuft das Markerprotein. Zwischen den einzelnen Proteinen bleibt eine Auftragsstelle frei, da das monomere Albumin in einer so großen Konzentration

vorliegt, daß die monomere Albuminbande zu den Seiten ausweicht und in die monomere Albuminbande des Nachbarproteins gelangt. Das Ineinanderlaufen der monomeren Albuminbanden versuchten wir zu verhindern, indem weniger Protein aufgetragen wurde. Es zeigte sich jedoch, daß dann die Konzentration der oligomeren Albumine und kontaminierenden Proteine nicht mehr ausreicht, um sich färberisch und immunologisch darzustellen.
Die Elektrophorese wird wie unter 3.5. beschrieben durchgeführt. Nach Beendigung der 1. Elektrophoresestufe schließt sich die Elektroimmundiffusionelektrophorese an. Dazu müssen antikörperhaltige Agarosegelplatten, wie unter 3.4.1. beschrieben, hergestellt werden. Das Stanzen von Löchern entfällt hierbei. Aus dem Polyacrylamid-Gel der 1. Trennung werden ca. 3 mm breite Streifen aus den Positionen 8 und 1o mit einer langen, schmalen und sehr scharfen Klinge geschnitten und auf die, für die 2. Trennung vorgesehene, unter Stromfluß stehende antikörperhaltige Agarosegelplatte kathodenwärts, quer zur Stromflußrichtung gelegt. Stauchungen und Zerrungen des Polyacrylamid-Gelstreifens müssen vermieden werden. Damit der Streifen besser auf dem Agarosegel haftet und während der Elektrophorese sich nicht durch Austrocknung abhebt, wird eine Glasscheibe von 1ox8o mm

auf den Streifen gelegt. Es wird mit einer Spannung von 1o V/cm für 6 Stunden gefahren.
Nach erfolgter Trennung wird der Polyacrylamid-Gelstreifen entfernt und die Agarosegelplatte wie unter 3.4.1. beschrieben gefärbt.
Die andere Hälfte der Polyacrylamid-Gelplatte der 1. Elektrophorese wird wie unter 3.5. beschrieben behandelt.

3.7. Isoelectric-Focusing

Prinzip:
Nach Anlegen eines elektrischen Stromes in einem Trägerampholyten mit einem definierten pH-Bereich entsteht ein pH-Gradient, der entsprechend der verschiedenen isoelektrischen Punkte des Trägerampholyten von der Anode zur Kathode ansteigt. Die Konvektion wird durch einen Dichtegradienten (Saccharose, Äthylenglykol, Glyzerin: für präparatives Isoelectric-Focusing) oder durch ein Gel (Polyacrylamid: für analytisches Isoelectric-Focusing) verhindert. Da Proteine amphotere Verbindungen sind, wandern sie, unabhängig von ihrem Auftragsort, an die Stelle ihres isoelektrischen Punktes, konzentrieren sich dort an und fallen aus. Je nach Fragestellung kann der pH-Gradient aufgearbeitet werden.

3.7.1. Präparatives Isoelectric-Focusing

Die Trennung wird in der 11o ml fassenden Säule des Typs LKB 81oo der Firma LKB-Producter, Stockholm, durchgeführt. Es wird ein Trägerampholyt des pH-Bereichs 4,o bis 6,o in Konzentrationen von 3% und 5% eingesetzt. Das Beschicken der Säule erfolgt weitgehend nach der Firmenanweisung. Dabei werden zwei Gradientenlösungen unterschiedlicher Dichte angesetzt, denen zu gleichen Teilen die Proben zugemischt werden. Die Lösungen für die Ampholytkonzentration von 3% sind in Tab. IV aufgeführt. Der Gradient wird mittels eines Gradientenmischers hergestellt. Zur Verhinderung von elektrischen Veränderungen an den Elektroden wird die Anode in Schwefelsäure und die Kathode in Natronlauge gehalten. Der Anodenlösung wird Saccharose zugesetzt, da sie mit der dichtesten Zone des Dichtegradienten in Kontakt steht. Die Anode befindet sich unten. Die Trennung wird bei 1o^{o}C und einer Spannung von ca. 9oo V über einen Zeitraum von 6o Stunden durchgeführt. Die Säule wird nach Abschluß der Trennung unter Druck mittels einer Rollerpumpe entleert. Die Ausflußgeschwindigkeit beträgt o,35 ml/Min. Es werden Fraktionen von 1,4 ml gesammelt. Die Extinktion wird in einem Durchfluß-Spektral-

photometer der Firma LKB-Producter, Stockholm, Uvicord II, Typ 8300, bei 280 nm gemessen. Die pH-Bestimmung erfolgt nach Entleerung der Säule durch ein Corning-pH-Meter, Typ 113, bei einer Temperatur von 20°C.
Der Gehalt der Fraktionen an Albumin wurde mit dem Elektroimmunoassay bestimmt (s. 3.4.1.). Die Molekularmassen werden mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese (s. 3.5.) und der Gelchromatographie (s. 3.8.) bestimmt.

	Schwere Gradientenlösung auf Basis Saccharose	Glyzerin	Äthylenglykol
Saccharose	27,o g	-	-
Glyzerin	-	3o,o ml	-
Äthylenglykol	-	-	4o,5 ml
Ampholine^{R}	6,o ml	6,o ml	6,o ml
Dest. Wasser	3o,4 ml	17,7 ml	6,2 ml
Probe 5o mg/ml	o,3 ml	o,3 ml	o,3 ml

	Leichte Gradientenlösung auf Basis Saccharose	Glyzerin	Äthylenglykol
Saccharose	2,7 g	-	-
Glyzerin	-	-	-
Äthylenglykol	-	-	-
Ampholine^{R}	2,o ml	2,o ml	2,o ml
Dest. Wasser	49,6 ml	51,7 ml	51,7 ml
Probe 5o mg/ml	o,3 ml	o,3 ml	o,3 ml

Tab. IV: Zusammensetzung der schweren und leichten Gradientenlösungen auf Basis Saccharose, Glyzerin oder Äthylenglykol bei einer 3%igen Ampholytkonzentration.

3.7.2. Dünnschicht-(Thin-Layer)-Isoelectric-Focusing

Die Durchführung erfolgt in der Elektrophoresekammer des Typs LKB 2117 Multiphor der Firma LKB-Producter, Stockholm. Als Trennplatten werden die LKB Ampholine^{R} PAG-Platten der obengenannten Firma mit einem pH-Bereich von 4 bis 6,5 verwendet.
Auf der Kühlplatte der Elektrophoresekammer wird wenig Wasser verteilt und ein Schablonenpapier luftblasenfrei aufgelegt und erneut wenig Wasser auf das Schablonenpapier verteilt. Die PAG-Platte wird entlang der gestrichelten Linie aufgeschnitten. Die Deckfolie und die auf dem Gel haftende Plastikfolie werden entfernt. Die unter dem Gel befindliche Plastikfolie wird mit dem Gel auf die Schablone luftblasenfrei überführt. Der Kontakt zwischen Elektrode und Geloberfläche wird durch einen Elektrofocusingstreifen hergestellt. Je ein Streifen wird mit der Anodenlösung: o,1 mol Glutaminsäure in o,5 mol H_3PO_4, der Kathodenlösung: o,1 mol beta-Alanin gut getränkt, auf die Geloberfläche aufgelegt und überstehende Streifenenden abgeschnitten. Hierauf erfolgt ein Isoelectric-Focusing ohne Proben zur Ausbildung eines pH-Gradienten. Nach 1 Stunde werden die Proben aufgelegt. Zur Probenaufgabe werden einzelne Filterpapiere von 5x1o mm verwendet.

Die Filterpapiere werden nach Schablone auf die Geloberfläche anodenwärts gelegt und 25 ul der verdünnten Probe mittels einer Hamilton-Mikropipette auf das Filterpapier pipettiert. Die aufgetragenen Proben sollten eine Albuminkonzentration von ca. 1,25 mg/ml enthalten. Eine Stunde wird focussiert, damit die Proteine in die Geloberfläche eindringen können, die Filterpapiere entfernt und zwei Stunden weiter focussiert. Die Trennung wird mit 2ooo V, 25 W und 25 mA bei 1o^{o}C durchgeführt. Sollte während der Durchführung sich Kondenswasser unter der Abdeckplatte bilden, wird die elektrische Spannung erniedrigt. Nach erfolgter Trennung wird mittels einer Oberflächen-pH-Elektrode mit dem Corning-pH-Meter, Typ 113, die Messung des pH-Gradienten vorgenommen. Der pH-Wert wird in einem Abstand von 1o mm gemessen. Je nach Fragestellung werden die PAG-Platten weiterverarbeitet. Sollen die Proteine mit der Laying-On-Methode untersucht werden, so werden Streifen aus der PAG-Platte geschnitten und wie unter 3.6. verfahren. Steht die Färbung im Vordergrund, wird die Platte 3o Minuten fixiert, danach 5 Minuten mit der Entfärber-Lösung gewaschen, anschließend ca. 1o Minuten mit einer 6o^{o}C warmen Färbelösung gefärbt. Hiernach wird überschüssiger Färber entfernt, bis das Gel durchsichtig

und die Proteinbanden noch gut zu sehen sind. Wird die Platte für eine Stunde in eine Konserviererlösung gelegt, so lange getrocknet, bis die Geloberfläche klebrig und matt wird, kann eine Plastikfolie mit einer Gummiwalze auf die Geloberfläche aufgedrückt werden. Die Gele lassen sich so gut photographieren und längere Zeit aufbewahren.

3.8. Gelchromatographie (Molekularsiebfiltration)

Prinzip:

Durch ein Gel mit verschiedenen Porenweiten können Proteinmischungen unterschiedlicher Molekularmasse und unterschiedlicher Molekülform getrennt werden. Proteine, die größer sind als die größten Gelporen, dringen nicht in das Gel ein, sondern wandern an ihnen vorbei und erscheinen zuerst im Eluat. Kleinere Proteine diffundieren in die Gelporen und werden um so stärker festgehalten, je mehr Poren für sie zugänglich sind. Sie erscheinen später im Eluat.

Methode und Durchführung:

Eine Chromatographiesäule der Firma Pharmacia, Freiburg, mit den Abmessungen 2,5 x 100 cm wird lotrecht aufgestellt und mit einem entgasten,0,5 molaren Kochsalz-

puffer gefüllt. 25 g Biogel P 2oo läßt man in ca. 1 l Puffer über Nacht quellen, anschließend mehrfach mit dem Puffer waschen. 6oo ml entgastes und gequollenes Biogel P 2oo läßt man aus einem Trichter spontan in die Säule sedimentieren. Nach 24 Stunden wird der überstehende Puffer mittels einer Rollerpumpe aus der Säule gepumpt. Steht der Pufferspiegel ca. 3 cm oberhalb des abgesetzten Gels, wird die Pumpe abgestellt und die obere Öffnung der Säule mit einem Adapter verschlossen. Nun wird die Säule 24 Stunden lang mit Puffer gewaschen. Die zu untersuchenden Albuminproben werden mit einem Eiweißgehalt von ca. 5o mg/ml und einem Volumen von 1 ml aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit beträgt o,6 ml/Min. Die Extinktion der Eluate wird in einem Durchfluß-Spektralphotometer der Firma LKB-Producter, Stockholm, Uvicord II, Typ 83oo, bei 28o nm gemessen und Fraktionen von 6 ml in einem Fraktionssammler gesammelt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Elektrolyt- und Glukosekonzentrationen, Osmolaritäts- und pH-Werte, hämolytische Wirkung der Humanalbuminkonzentrate

In den Tab. V und VI sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Der Elektrolytgehalt der 5% isotonischen Humanalbuminkonzentrate stellt sich wie folgt dar:
Alle Proben sind stark kalium- und calciumarm.
Der Kaliumwert liegt zwischen o,5 und 1,2 mmol/l, der Calciumwert zwischen o,4 und 1,6 mmol/l.
Die Proben 3 und 7 weisen Natriumwerte im Serumnormbereich auf.
Die Proben 2 und 9 sind mit 158 mmol/l leicht natriumreich. Stark natriumarm ist die Probe 4 mit 44 mmol/l und die Probe 6 mit 69 mmol/l. Die übrigen Proben sind leicht natriumarm.
Chloridwerte im Serumnormbereich weisen die Proben 3, 5 und 8 auf. Die Proben 2, 7 und 9 sind mit Chloridwerten zwischen 12o und 137 mmol/l chloridreich.
Sehr stark chloridarm ist die Probe 1 mit 52 mmol/l, Probe 4 mit 2o mmol/l und die Probe 6 mit 12 mmol/l.

Nur die Proben 4, 5, 6 und 7 weisen einen Glukosegehalt auf. Die Proben 5 und 7 besitzen Glukosewerte von 3o bzw. 41 mmol/l, die Probe 6 einen von 145 mmol/l. Den höchsten Glukosegehalt von 25o mmol/l weist die Probe 4 auf.
Eine physiologische Serumosmolarität zeigen die Proben 2, 3, 7 und 9. Die Probe 4 weist mit 35o mOsmol/l die größte Osmolarität auf. Zwischen 22o und 28o mOsmol/l liegen die übrigen Proben.
Die Probe 1 weist einen pH-Wert von 7,26 auf, die anderen Proben liegen zwischen 6,58 und 7,o2.
Eine hämolysierende Wirkung zeigen die Proben 4 und 6.

Der Elektrolytgehalt der 2o% hyperonkotischen Humanalbuminkonzentrate stellt sich wie folgt dar:
Alle Proben sind mit einem Kaliumgehalt von o,9 bis 1,1 mmol/l stark kaliumarm.
Calciumarm sind die Proben 13a, 15, 16, 17, 19 und 2o.
Die Probe 18 weist den höchsten Calciumwert von 3,o mmol/l auf. Die übrigen Proben liegen im Serumnormbereich.

Die Proben 14 und 21 weisen Natriumwerte im Serumnormbereich auf. Die Proben 15, 16 und 17 sind mit Natriumwerten zwischen 177 und 2o6 mmol/l stark natriumreich.

Probe	Elektrolyte mit Serumnormalwerten			
	Kalium 3,8-5 mmol/l	Natrium 135-147 mmol/l	Calcium 2,2-2,7 mmol/l	Chlorid 98-1o7 mmol/l
1	o,8	122	o,9	52
2	1,2	158	1,3	12o
3	o,9	134	1,3	11o
4	o,8	44	o,9	2o
5	o,7	114	o,4	1o9
6	1,1	69	1,6	12
7	o,7	137	o,5	122
8	o,7	127	o,9	1o4
9	o,7	157	o,8	137
11	o,9	13o	2,6	-
12	o,9	9o	2,6	-
13	1,o	12o	2,4	22
13a	o,9	119	2,o	3o
14	o,9	133	2,5	47
15	1,o	188	o,6	146
16	o,9	2o6	o,5	175
17	o,9	177	o,5	138
18	1,1	122	3,o	15
19	o,9	8o	2,o	-
2o	o,9	89	1,5	38
21	1,o	134	2,3	33

Tab.V: Elektrolytgehalt der 5- und 2o%igen Humanalbuminkonzentrate.

Probe	Glukose 3,9-5,6 mmol/l	Osmolarität 29o-31o mOsmol/l	pH	Hämolyse
1	-	22o	7,26	-
2	-	285	6,69	-
3	-	315	6,94	-
4	25o	35o	6,74	nach 2,4,8 Std.
5	3o	28o	6,58	-
6	145	255	6,72	nach 2,4,8 Std.
7	41	3o5	6,74	-
8	-	23o	6,78	-
9	-	285	7,o2	-
11	-	22o	7,o3	-
12	-	19o	6,26	-
13	-	29o	6,72	-
13a	-	29o	6,8o	-
14	-	23o	7,o3	-
15	23	43o	6,45	-
16	23	5oo	6,34	-
17	25	4oo	6,48	-
18	-	24o	6,91	-
19	-	225	6,96	-
2o	-	15o	6,63	-
21	-	215	7,o3	-

Tab.VI: Glukosegehalt, Osmolaritäts- und pH-Werte, hämolytische Wirkung der 5- und 2o%igen Humanalbuminkonzentrate.

Die übrigen Proben weisen hingegen nur einen Natriumgehalt von 8o bis 13o mmol/l auf.
Chloridwerte im Serumnormbereich weist keine Probe auf. Die Proben 15, 16 und 17 sind stark chloridreich mit Werten zwischen 138 und 175 mmol/l. Die Proben 13, 13a, 14, 18, 2o und 21 besitzen Chloridkonzentrationen von <5o mmol/l. Chloridfrei sind die Proben 11, 12 und 19.
Nur die Proben 15, 16 und 17 weisen einen Glukosegehalt von 23 bis 25 mmol/l auf.
Eine physiologische Serumosmolarität zeigen die Proben 13 und 13a. Die Proben 15, 16 und 17 weisen mit Werten zwischen 4oo und 5oo mOsmol/l eine Osmolarität auf.
Die übrigen Proben besitzen Osmolaritäten von 15o bis 24o mOsmol/l.
Der pH-Wert liegt zwischen 6,26 bis 7,o3.
Eine hämolysierende Wirkung zeigen die 2o% Humanalbuminkonzentrate nicht.

Zusammenfassend sind in der Regel die 5% isotonischen Albuminkonzentrate neutral bis schwach sauer, stark kalium- und calciumarm, weisen niedrige bis erhöhte Natrium- und Chloridwerte auf, sind z.T. glukosehaltig und weisen z.T. eine hämolysierende Wirkung auf, mit Osmolaritäten um den physiologischen Serumnormbereich.

Die 2o% hyperonkotischen Albuminkonzentrate sind in der Regel neutral bis schwach sauer, stark kaliumarm mit meist normalen Calciumserumnormwerten, weisen niedrige bis erhöhte Natrium- und Chloridwerte auf, sind z.T. glukosehaltig, weisen keine hämolysierende Wirkung auf und besitzen z.T. erniedrigte bis stark erhöhte Osmolaritäten.
Unterschiede zwischen den 5% und 2o% Albuminkonzentraten: Im Gegensatz zu den stark calciumarmen 5% Albuminkonzentraten weisen die 2o% Albuminkonzentrate meist Calciumwerte im Serumnormbereich auf. Die 5% Albuminkonzentrate weisen im Mittel höhere Chloridwerte auf als die 2o% Albuminkonzentrate. Einige 2o% Albuminkonzentrate sind chloridfrei. Enthalten die Albuminkonzentrate Glukose, so ist die Glukosekonzentration in den 5% Albuminkonzentraten höher als in den 2o% Albuminkonzentraten.
Eine hämolysierende Wirkung zeigen nur einige 5% Albuminkonzentrate.

4.2. Der Gesamtprotein-, der absolute und relative Albumingehalt der Humanalbuminkonzentrate

Der Gesamtprotein- und Albumingehalt sind in der Tab. VII aufgeführt.

Bei den 5% isotonischen Albuminkonzentraten beträgt der Gesamtproteingehalt, gemessen mit der Biuret-Methode, zwischen 54,9 bis 61,8 g/l. Der absolute Albumingehalt (ausgenommen Probe 1 und 5) liegt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, zwischen 49,7 und 54,4 g/l, der relative Albumingehalt zwischen 9o und 94% (ausgenommen Probe 1, 5 und 6). Gemessen mit Bromcresolgrün liegt der absolute Albumingehalt zwischen 5o,8 und 53,9 g/l, der relative Albumingehalt zwischen 9o und 92% (ausgenommen Probe 1, 5 und 6).
Bei den PPL-Konzentraten: Proben 1 bzw. 5 beträgt der Gesamtproteingehalt 52,9 bzw. 55,4 g/l. Der absolute bzw. relative Albumingehalt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, beträgt 45,7 g/l bzw. 86% und 19,6 g/l bzw. 35,4%. Mit Bromcresolgrün ergeben sich Werte von 49,7 g/l bzw. 94% und 25,4 g/l bzw. 46%. Neben einem hohen Gesamtproteingehalt von 61,8 g/l weist die Probe 6 auch einen absoluten Albumingehalt von 5o,9 bzw. 52,6 g/l auf, jedoch beträgt der relative Albumingehalt nur 82 bzw. 85%.

Bei den 2o% hyperonkotischen Albuminkonzentraten beträgt der Gesamtproteingehalt, gemessen mit der Biuret-Methode, zwischen 2o8,2 und 23o,2 g/l (ausgenommen Probe 11).

Der absolute Albumingehalt (ausgenommen Probe 11 und 12) liegt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, zwischen 2o1 und 219,3 g/l. Der relative Albumingehalt zwischen 92 und 1oo%.

Gemessen mit Bromcresolgrün liegt der absolute Albumingehalt zwischen 2oo und 214,1 g/l. Der relative Albumingehalt zwischen 9o und 97% (ausgenommen Probe 11 und 12).

Bei Probe 11, einem 25% PPL-Konzentrat, liegt der Gesamtproteingehalt bei 263,9 g/l, der absolute bzw. relative Albumingehalt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, bei 263,9 g/l bzw. 1oo%, gemessen mit Bromcresolgrün bei 235,8 g/l bzw. 89%.

Die Probe 12 besitzt einen Gesamtproteingehalt von 2o8,6 g/l. Jedoch liegt der absolute Albumingehalt bei beiden Albuminbestimmungsmethoden knapp unter 2oo g/l, der relative Albumingehalt aber zwischen 93 und 94%.

Bei den Proben 15, 16 und 17 fällt der hohe Gesamtproteingehalt von 226 bis 23o g/l auf. Der absolute bzw. relative Albumingehalt liegt bei diesen Proben, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, zwischen 2o8,1 und 219,3 g/l bzw. 92 und 95%, gemessen mit Bromcresolgrün zwischen 2o3,9 und 214,1 g/l bzw. 9o und 93%.

Probe	Methode:	Gehalt in g/l und % an Gesamtprotein Albumin Biuret g/l	Elektroimmundiffusion g/l	 %	Bromcresolgrün g/l	 %
1		52,9	45,7	86	49,7	94
2		59,5	54,4	91	53,3	9o
3		54,9	49,7	9o	5o,8	92
4		55,5	52,o	94	51,o	92
5		55,4	19,6	35	25,4	46
6		61,8	5o,9	82	52,6	85
7		58,4	54,2	93	53,4	91
8		58,o	54,1	92	51,9	9o
9		59,4	54,2	91	53,9	91
11		263,9	263,9	1oo	235,8	89
12		2o8,6	194,6	93	196,4	94
13		21o,7	21o,6	1oo	2o3,o	96
13a		2o8,2	2o4,3	98	2o1,4	97
14		212,o	2o1,o	95	2oo,o	95
15		226,o	212,5	94	2o9,1	93
16		23o,2	219,3	95	214,1	93
17		226,o	2o8,1	92	2o3,9	9o
18		2o9,5	2o1,o	96	2oo,o	96
19		215,7	2o5,6	95	2o2,7	94
2o		211,o	2o1,o	95	2oo,o	95
21		216,6	2o3,6	94	21o,6	97

Tab.VII: Der Gesamtprotein-, der absolute und relative Albumingehalt der 5% und 2o% Albuminkonzentrate, gemessen mit der Biuretmethode, Elektroimmundiffusion und mit Bromcresolgrün.

Der Gesamtprotein-, der absolute und relative Albumingehalt der 5% isotonischen Albuminkonzentrate stellt sich wie folgt dar:
Alle Proben besitzen einen Gesamtproteingehalt von über 5o g/l. Der absolute Albumingehalt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion wie auch mit Bromcresolgrün, liegt ebenfalls über 5o g/l, der relative Albumingehalt über 9o%.

Bei den 2o% hyperonkotischen Albuminkonzentraten stellt sich der Gesamtprotein- und Albumingehalt wie folgt dar:
Alle Proben besitzen einen Gesamtproteingehalt von über 2oo g/l. Der absolute Albumingehalt, gemessen mit der Elektroimmundiffusion wie auch mit Bromcresolgrün, liegt ebenfalls über 2oo g/l. Der relative Albumingehalt liegt über 9o%.

4.3. Quantitative Bestimmung kontaminierender Proteine in Humanalbuminkonzentraten mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion

Die kontaminierenden Proteine in den Albuminkonzentraten sind in den Tab. VIIIa und VIIIb zusammengefaßt.
Die 5% Albuminkonzentrate weisen keine Kontamination mit

Immunglobulinen, C_3c, C_4, alpha-2-Makroglobulin, Fibrinogen, AT-III, Plasminogen und Prothrombin, auf. Die im folgenden aufgeführten Proteine sind in minimalen Konzentrationen in den 5% Albuminkonzentraten vorhanden und erreichen nie den Serumnormalgehalt des jeweiligen Proteins.

Außer den Proben 6 und 9 zeigen alle anderen Proben einen Transferringehalt von 4 bis 8 mg/dl, wobei die Proben 6 und 9 einen Transferringehalt von 46 bzw. 5o mg/dl aufweisen.

Außer der haptoglobinfreien Probe 7 zeigen die Proben 2 und 4 einen Haptoglobingehalt von 2 bzw. 4 mg/dl, die übrigen Proben einen Gehalt von 16 bis 31 mg/dl.

Eine Haemopexinkonzentration von 4 bis 1o mg/dl besitzen die Proben 3, 8 und 9.

Einen alpha-1-Antitrypsinanteil von 4 bis 8 mg/dl zeigen die Proben 6, 7 und 9.

Nur die Probe 9 weist einen alpha-2-Makroglobulingehalt von 17 mg/dl auf.

Die PPL-Konzentrate 1 und 5 weisen eine über dem Serumnormgehalt liegende Transferrin- und Haptoglobinkonzentration auf, die Probe 5 enthält sogar Immunglobuline.

Protein:	IgG	IgA	IgM	C3c	Transferrin	C4	Haptoglobulin	alpha-2-Makroglobulin
Normalwert:	92-2o7	54-268	69-287	55-12o	2oo-4oo	2o-5o	1oo-3oo	15o-42o
Einheit:	UI/ml	UI/ml	UI/ml	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Molmasse:	15oooo	16oooo		185ooo	9oooo	23oooo	1ooooo	82oooo
Probe 1	-	-	-	-	285	-	47	-
2	-	-	-	-	6	-	4	-
3	-	-	-	-	6	-	23	-
4	-	-	-	-	8	-	2	-
5	97	248	113	72	81o	-	366	3o5
6	-	-	-	-	46	-	31	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	4	-	16	-
9	-	-	-	-	5o	-	22	17
11	-	-	-	-	7	-	43	-
12	-	-	-	-	156	-	-	-
13	-	-	-	-	2o8	-	15	-
13a	-	-	-	-	16	-	65	-
14	-	-	-	-	89	-	65	-
15	-	-	-	-	7	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	29	-	26	-
19	-	-	-	-	9o	-	6	-
2o	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	62	-	155	-

Tab.VIIIa: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung kontaminierender Proteine in Humanalbuminkonzentraten mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion auf Partigen®-Platten der Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

Protein:	Haemopexin	Fibrinogen	alpha-1-Antitrypsin	Antithrombin III	Plasminogen	Prothrombin
Normalwert:	5o-115	2oo-45o	2oo-4oo	17-3o	1o-3o	5-1o
Einheit:	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Molmasse:	8oooo	341ooo	54ooo	65ooo	815oo	6oooo
Probe 1	1o	-	6	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	1o	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	35	-	98	-	-	-
6	-	-	4	-	-	-
7	-	-	4	-	-	-
8	4	-	-	-	-	-
9	4	-	8	-	-	-
11	-	-	6	-	-	-
12	-	-	7	-	-	-
13	5	-	6	-	-	-
13a	5	-	6	-	-	-
14	5	-	9	-	-	-
15	-	-	7	-	-	-
16	-	-	6	-	-	-
17	-	-	5	-	-	-
18	-	-	4	-	-	-
19	-	-	7	-	-	-
2o	-	-	2	-	-	-
21	13	-	11	-	-	-

Tab.VIIIb: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung kontaminierender Proteine in Humanalbuminkonzentraten mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion auf Partigen®-Platten der Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

Die 2o% Albuminkonzentrate weisen keine Kontamination mit Immunglobulinen, C_3c, C_4, alpha-2-Makroglobulin, Fibrinogen, AT-III, Plasminogen und Prothrombin, auf. Außer den transferrinfreien Proben 16, 17 und 2o weisen die übrigen Proben einen Transferringehalt von 7 bis 2o8 mg/dl auf. Die Proben 11 und 15 besitzen dabei die geringste, die Proben 12 und 13 die höchste Transferrinkonzentration.
Außer den haptoglobinfreien Proben 12, 15, 16, 17 und 2o weisen die übrigen Proben einen Haptoglobingehalt von 6 bis 155 mg/dl auf, wobei die Probe 19 den geringsten, die Probe 21 den höchsten Gehalt von 155 mg/dl Haptoglobin aufweist.
Einen Haemopexingehalt von 5 bis 13 mg/dl besitzen nur die Proben 13, 13a, 14 und 21.
Alle Proben weisen einen alpha-1-Antitrypsinanteil von 2 bis 11 mg/dl auf.
Außer der Probe 13, mit einem Transferringehalt von 2o8 mg/dl, erreicht kein kontaminierendes Protein einen Gehalt, der dem Serumnormalgehalt des Proteins entspricht.

Die 5% Albuminkonzentrate weisen in der Regel einen geringen Gehalt an kontaminierenden Proteinen mit Molmassen zwischen 54.ooo und 1oo.ooo auf. Transferrin

und Haptoglobin sind stets vorhanden, fakultativ können Haemopexin und alpha-1-Antitrypsin nachgewiesen werden.

Die 2o% Albuminkonzentrate weisen ebenfalls in der Regel einen Gehalt von kontaminierenden Proteinen mit Molmassen zwischen 54.ooo und 1oo.ooo auf. Neben dem stets in hoher Konzentration enthaltenen Transferrin und Haptoglobin befinden sich auch geringe alpha-1-Antitrypsinkonzentrationen. Haemopexin wird fakultativ nur in geringen Konzentrationen gefunden.

Unterschiede zwischen den 5% und 2o% Humanalbuminkonzentraten:
Die isotonischen wie auch die hyperonkotischen Albuminkonzentrate enthalten die kontaminierenden Proteine Transferrin, Haptoglobin, Haemopexin und alpha-1-Antitrypsin mit den Molmassen zwischen 54.ooo und 1oo.ooo. Ist das alpha-1-Antitrypsin bei den 5% Albuminkonzentraten nur fakultativ in geringsten Konzentrationen vorhanden, so befinden sich in den 2o% Albuminkonzentraten stets geringste alpha-1-Antitrypsinkonzentrationen.

Haemopexin ist in allen Albuminkonzentraten fakultativ nur in geringen Konzentrationen vorhanden.
Transferrin und Haptoglobin ist in den 5% Albuminkonzentraten häufiger nachzuweisen als bei den 2o% Albuminkonzentraten, jedoch werden bei den hyperonkotischen Proben die höchsten Transferrin- und Haptoglobinkonzentrationen nachgewiesen.

4.4. Elektrophoretische Auftrennung der Humanalbuminkonzentrate mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese und immunologische Bestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Albuminkonzentrate mit der Laying-On-Methode

Die Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophoresen wurden auf Polyacrylamidflachgelen mit den Gradienten 4/3o und 2/16 und mit verschiedenen Herstellungschargen gefahren.
Die Humanalbuminbanden wurden mit der Laying-On-Methode immunologisch identifiziert. Als Albuminantikörper-haltige Seren wurden Präparate verschiedener Firmen und unterschiedlicher Chargen verwendet.
Die elektrophoretische Auftrennung der Humanalbuminkonzentrate gibt die Abb.1 wieder.
Breite Albuminbanden stellen sich bei den Molmassen

67.ooo, 14o.ooo, 24o.ooo, 38o.ooo und 52o.ooo dar. Schmale Proteinbanden mit einer Molmasse von kleiner der des monomeren Humanalbumins werden bei allen Proben gefunden. An der Anode befindet sich ein Albuminspaltprodukt mit einer Molmasse von etwa 38.ooo Daltons. Zwischen dem monomeren und dimeren Humanalbumin treten ebenfalls bei allen Albuminkonzentraten mehr oder weniger viele schmale Proteinbanden auf. Die kontaminierenden Proteine liegen mit ihren Molmassen in diesem Intervall.

In dem Bereich zwischen 14o.ooo und 38o.ooo Daltons befindet sich nur eine Albuminbande bei 24o.ooo Daltons.

Eine Albuminbande mit einer Molmasse von ca. 52o.ooo zeigt sich sowohl bei den gefärbten Polyacrylamidgelen als auch mit der Laying-On-Methode.

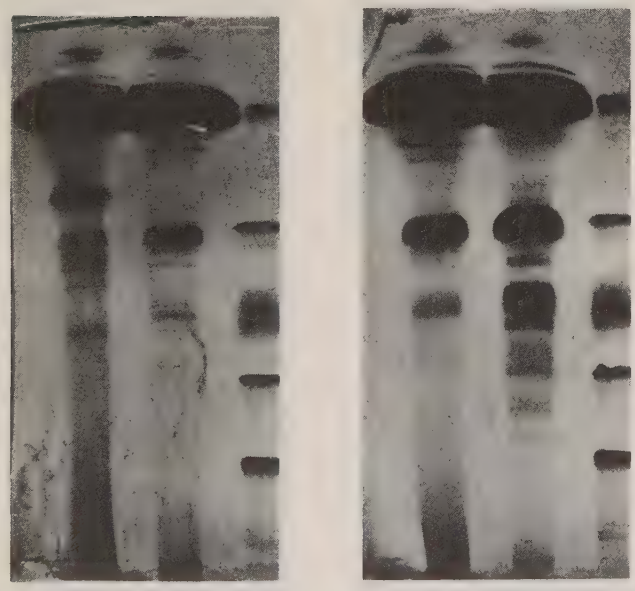
Die Molmassenbestimmungen waren sowohl mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese als auch mit der Laying-On-Methode gut reproduzierbar.

Bei der Laying-On-Methode stimmten die Humanalbuminbanden bei unterschiedlicher Provenienz als auch verschiedenen Chargen der antikörperhaltigen Seren überein. Differenzen waren nur im Antikörpertiter vorhanden.

Abb.1: Elektrophoretische Auftrennung der Albuminkonzentrate mit der Polyacrylamid-4/3o-Gradienten-Elektrophorese.

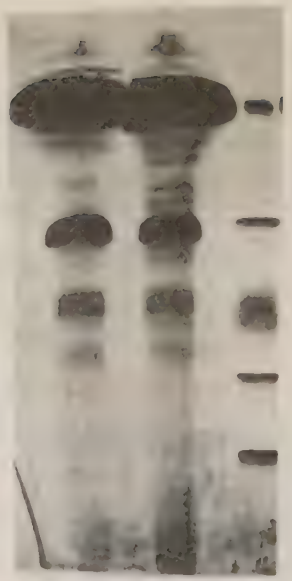
Der Electrophoresis Calibration Kit bestand aus den Proteinen mit den Molmassen:

1.	Albumin	67.ooo Daltons
2.	Laktat Dehydrogenase	14o.ooo Daltons
3.	Katalase	232.ooo Daltons
4.	Ferritin	44o.ooo Daltons
5.	Thyroglobulin	669.ooo Daltons

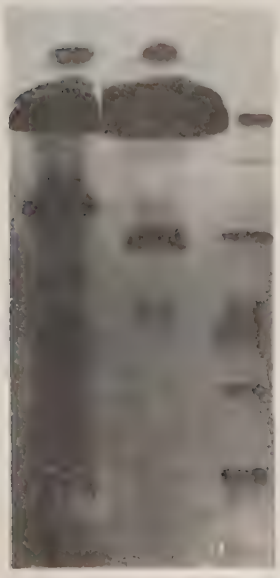


Probe 1 Probe 11 Kit Probe 2 Probe 12 Kit

Probe 3 Probe 13 Kit

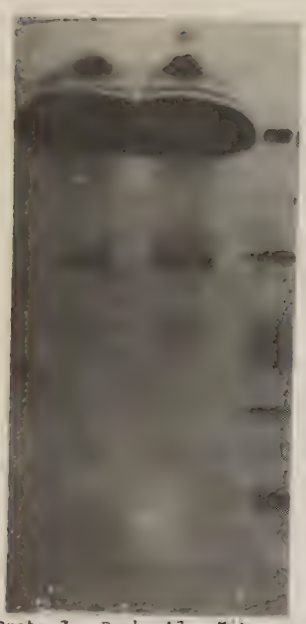


Probe 4 Probe 14 Kit

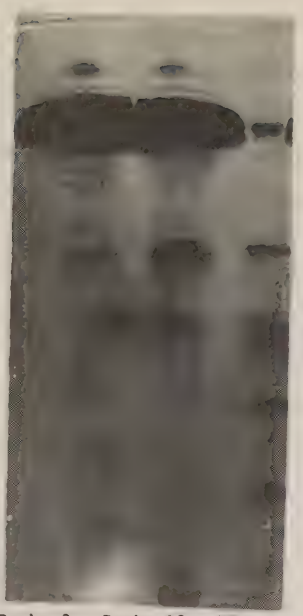


Probe 5 Probe 15 Kit

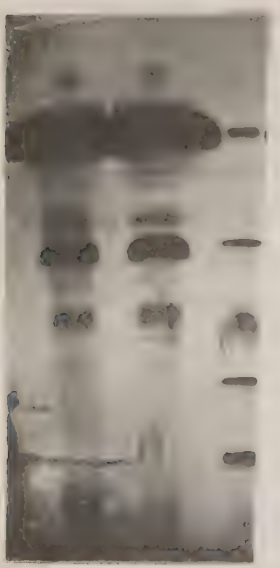
Kit Probe 6 Probe 16



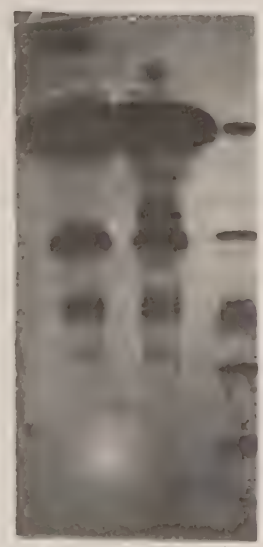
Probe 7 Probe 17 Kit



Probe 8 Probe 18 Kit



Probe 9 Probe 19 Kit



Probe 2o Probe 21 Kit

Nachdem wir in Vorversuchen geklärt hatten, daß eine einwandfreie, scharf begrenzte Präzipitation des Humanalbumin-Antikörper-Komplexes nur in dem Tris-Barbitursäure-Calciumlactat-Elektrophoresepuffer mit einem pH von 8,6 und einer Calciumlactatkonzentration von 14o mg pro Liter Puffer möglich war, wurden alle Polyacrhylamid-Gradienten- und Laying-On-Elektrophoresen mit diesem Puffer gefahren.

Eine Quantifizierung der einzelnen Humanalbuminoligomere konnte mit der Laying-On-Methode nicht vorgenommen werden, da

1. das monomere Albumin in so großer Konzentration vorliegt, daß der gebildete Antigen-Antikörper-Peak weit über die Agarosegelplatte bis in das Elektrodenpapier reichte und
2. die sehr kleine Fläche der Albuminoligomere sich nur schwerlich errechnen ließ.

Die Produkte 7, 8, 15, 16 und 17 zeigten fast ausschließlich nur monomeres und dimeres Albumin. Höhere Albuminoligomere und andere Proteinbanden fehlten fast völlig.

4.5. Analytische isoelektrische Auftrennung der Albuminkonzentrate mit der Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik und Bestimmung der Albuminbanden mit der Laying-On-Methode

Da die Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Humanalbumins (s.Tab.II) in der Literatur (77, 78) oft beschrieben wurde, versuchten wir, mit der analytisch ausgerichteten Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik in einem pH-Bereich von 4 bis 6,5 die Albuminkonzentrate zu untersuchen.
In ersten Versuchen wurden gepooltes Frischplasma, lyophilisiertes Humanalbumin reinst und die Albuminkonzentrate verglichen. Die Versuche zeigten in dem pH-Gradienten von 4 bis 6,5 zwei Intervalle von nah beieinanderliegenden Proteinbanden bei den Albuminkonzentraten (Abb.2) und dem lyophilisierten Humanalbumin. Bei dem gepoolten Frischplasma waren über dem gesamten pH-Gradienten Proteinbanden vorhanden. Das anodennahe Intervall erstreckte sich von pH 4,4 bis 5,o5, das kathodennahe Intervall von 5,3 bis 5,45. Mit der Laying-On-Methode zeigten sich im anodennahen Intervall drei miteinander verschmolzene Humanalbuminpeaks. Im kathodennahen Intervall fand sich nur ein schmalbasiger Humanalbuminpeak.

Mit der Laying-On-Methode wurden zwischen dem gepoolten Frischplasma, dem lyophilisierten Humanalbumin reinst und den Albuminkonzentraten keine Unterschiede gefunden. Die analysierten Albuminkonzentrate glichen sich "wie ein Ei dem anderen".

In weiteren Versuchen wurden die Albuminkonzentrate 24 Stunden lang gegen eine 1% Ampholytlösung, pH 4 bis 6,5 bzw. gegen dest. Wasser dialysiert, um eine gleiche Ionenzusammensetzung der Proben zu erreichen, bevor sie isoelektrisch aufgetrennt wurden. Es konnte jedoch zu den oben beschriebenen Ergebnissen kein optisch sichtbarer Unterschied gefunden werden.

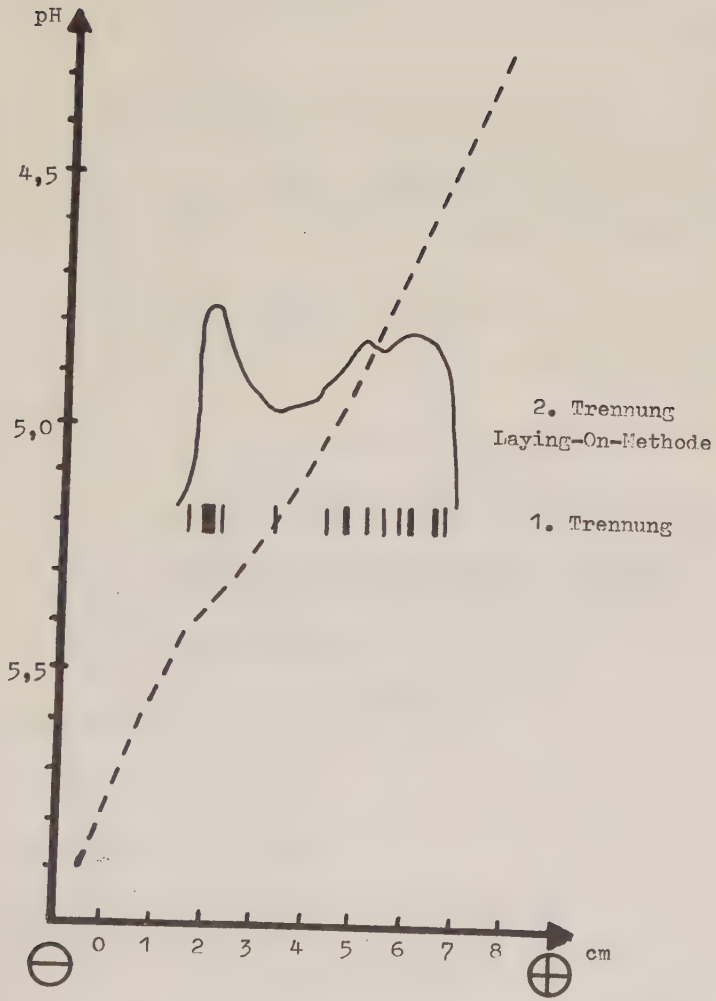


Abb.2: Dünnschicht-Isoelectric-Focusing von Humanalbumin aus Humanalbuminkonzentraten. Ordinate: pH-Gradient (— — — —). Abszisse: Trennstrecke in cm.

4.6. Präparatives Isoelectric-Focusing der Humanalbuminkonzentrate

Zunächst wurde die Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Humanalbumins in den Albuminkonzentraten, im lyophilisierten Humanalbumin reinst und im gepoolten Frischplasma präparativ in einem Saccharose-Gradienten dargestellt.
Unterschiede zwischen den einzelnen isoelektrischen Punkten in den Albuminpräparaten zeigten sich dabei nicht.
Die Abhängigkeit der Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Albumins vom Fettsäuregehalt des Humanalbumins beschrieb VALMET (79). Wir versuchten nun, zur Frage der Abhängigkeit der Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Albumins vom Dichtegradienten und von der Konzentration des Trägerampholyten sowie dessen "Reinigung" Stellung zu nehmen. In den drei Dichtegradienten Saccharose, Glyzerin bzw. Äthylenglykol ergab sich ein pI von 5,3 bis 5,4 (Abb.3-5). Im sauren Bereich zeigten der Saccharose- und Glyzerin-Gradient im pH-Intervall von 4,5 bis 5,o mehrere isoelektrische Punkte. Der Äthylenglykol-Gradient zeigte einen großen Albuminpeak mit einem pI von 4,99 und einen angedeuteten Albuminpeak mit einem pI von 4,83.

	Dichtegradient		
	Saccharose	Glyzerin	Äthylenglykol
Zahl der Fraktionen und pI	1) 5,38	1) 5,35	1) 5,32
	2) 5,04		
	3) 4,94	2) 4,96	2) 4,99
		3) 4,83	3) 4,83
	4) 4,73	4) 4,73	
	5) 4,50		

Tab.IX: Präparatives Isoelectric-Focusing von Humanalbumin in verschiedenen Gradienten.

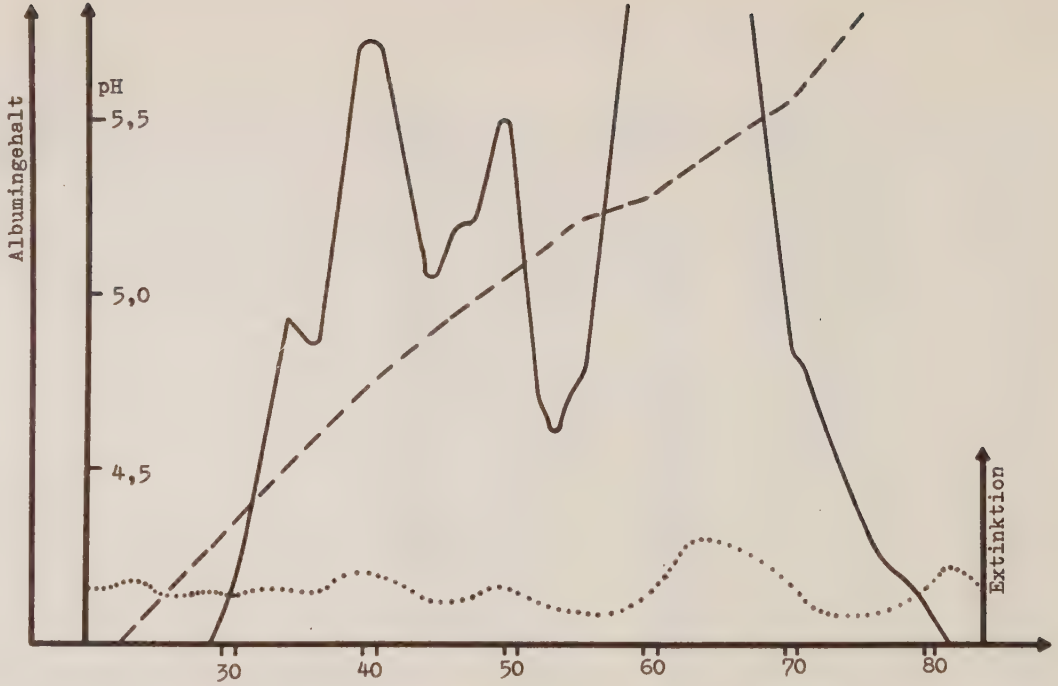


Abb.3: Präparatives Isoelectric-Focusing eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Saccharose-Gradienten. (Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ————— , Extinktion bei 28o nm ····· , Abszisse: Anzahl der Fraktionen: ———|———|———).

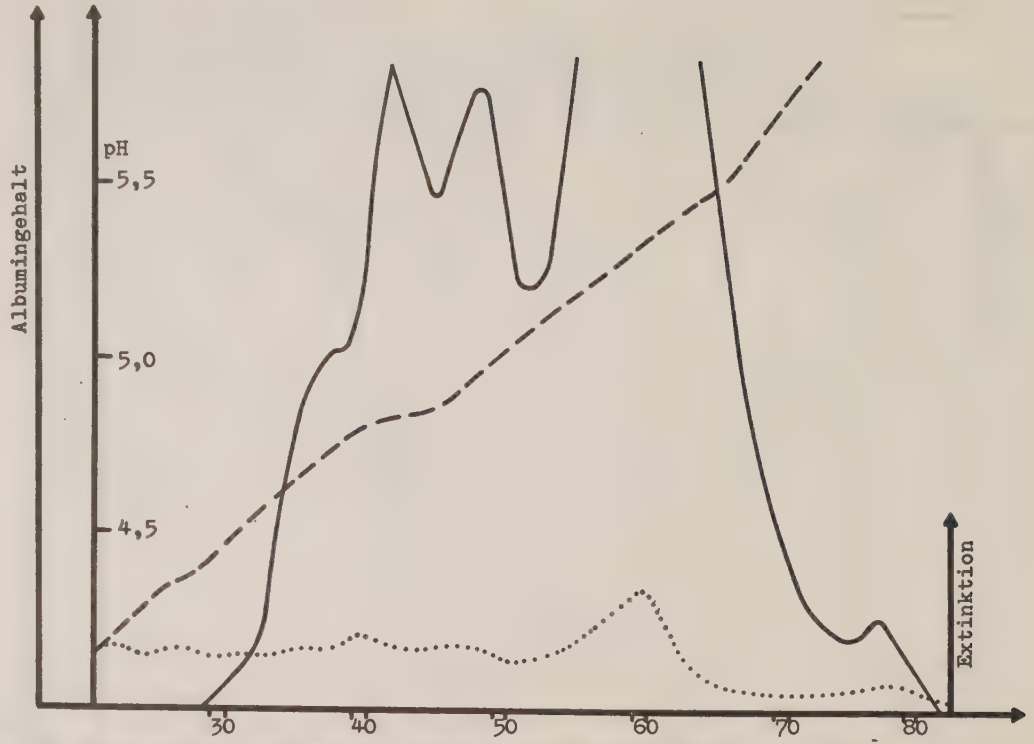


Abb.4: Präparatives Isoelectric-Focusing eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Glyzerin-Gradienten.
(Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ————, Extinktion bei 280 nm ……, Abszisse: Anzahl der Fraktionen ——).

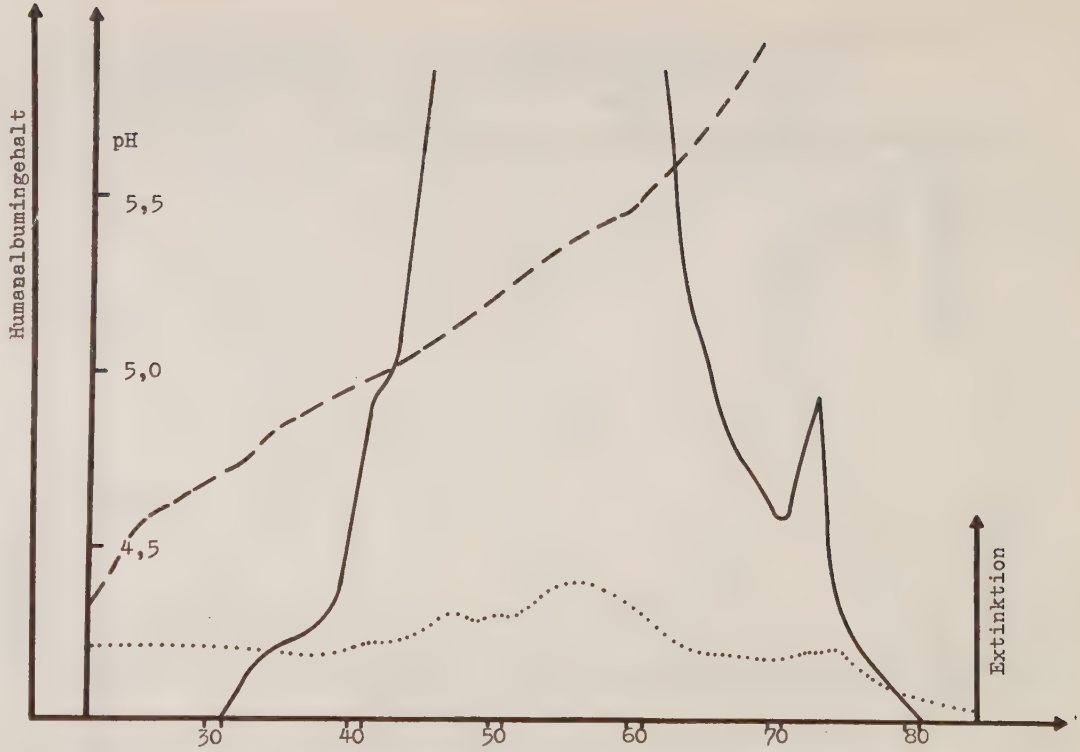


Abb.5: Präparatives Isoelectric-Focusing eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Äthylenglykol-Gradienten. (Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ————— , Extinktion bei 28o nm ····· , Abszisse: Anzahl der Fraktionen ——|——|——).

Unterhalb von pH 4,2 fand sich kein Albumin. Beim Glyzerin- und Äthylenglykol-Gradienten fand sich Albumin oberhalb von pH 6,o.
Die Separation in 3% und 5% Trägerampholyten zeigte keinen Einfluß auf die Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Albumins.
Inwieweit sich eine "Reinigung" des Ampholyten auf die Heterogenität des isoelektrischen Punktes auswirkt, zeigen die Abb. 6 und 7. Es wurde ein 24-stündiges Isoelectric-Focusing ohne Probe gefahren, der pH-Bereich 4,3 bis 5,5 gesammelt und mit diesem Ampholyten ein Isoelectric-Focusing mit Probe gefahren.
Ein Splitten in mehrere isoelektrische Punkte unterhalb von pH 5,o trat nicht auf. Es entstand ein Albuminpeak mit einem pI von 4,83. Dieses Verhalten fand sich bei allen untersuchten Albuminpräparaten.
Weiter versuchten wir die Frage zu klären, ob die Heterogenität des isoelektrischen Punktes des Albumins durch die Albuminoligomere bedingt sein könnte und wie die isoelektrischen Punkte des monomeren und dimeren Albumins sind. Die einzelnen Fraktionen des Isoelectric-Focusing wurden mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese, mit der Laying-On-Methode und der Gelchromatographie untersucht. Wir fanden dabei in allen

Fraktionen monomeres und dimeres Humanalbumin.
Durch Gelchromatographie gewonnenes monomeres und dimeres Humanalbumin wurde in einem Isoelectric-Focusing aufgetrennt. Sowohl das monomere (Abb.8) wie auch das dimere Albumin wiesen eine Heterogenität des isoelektrischen Punktes auf.

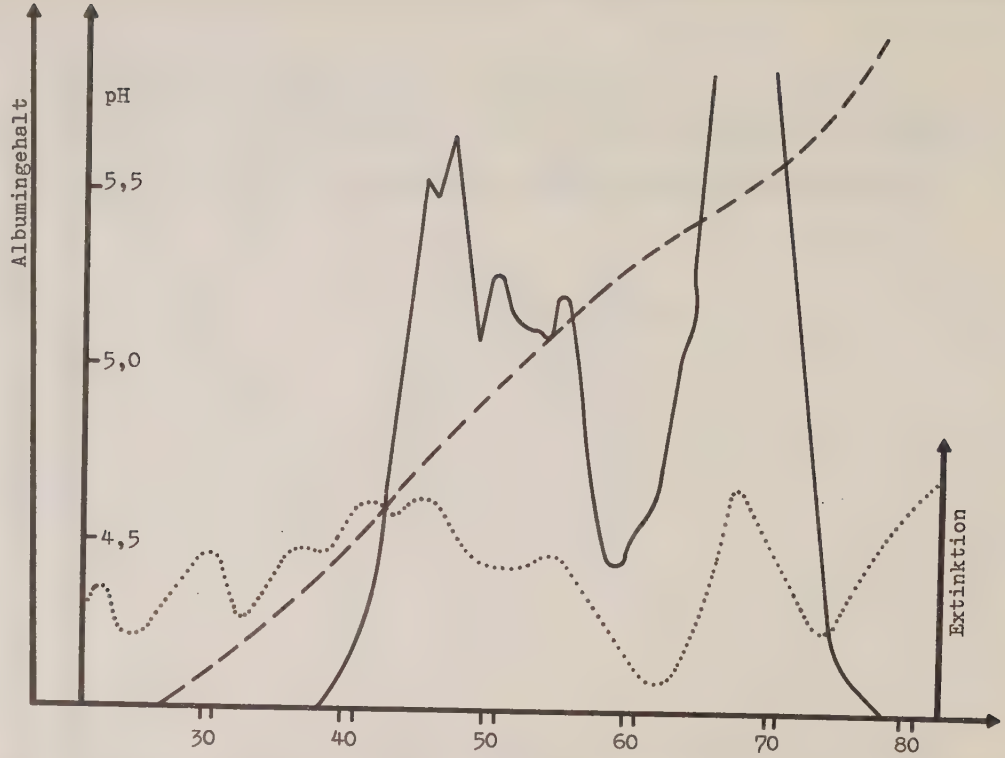


Abb.6: Präparatives Isoelectric-Focusing eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Saccharose-Gradienten vor "Reinigung" des Ampholyten. (Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ————— , Extinktion bei 280 nm ····· , Abszisse: Anzahl der Fraktionen ═══).

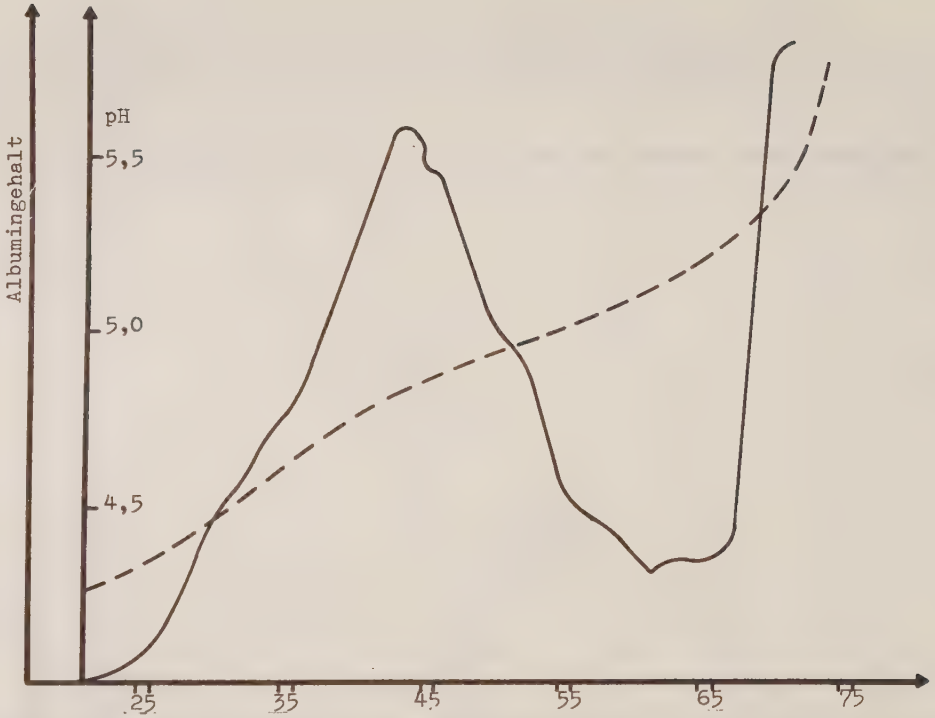


Abb.7: Präparatives Isoelectric-Focusing eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Saccharose-Gradienten nach "Reinigung" des Ampholyten. (Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ————, Abszisse: Anzahl der Fraktionen ———).

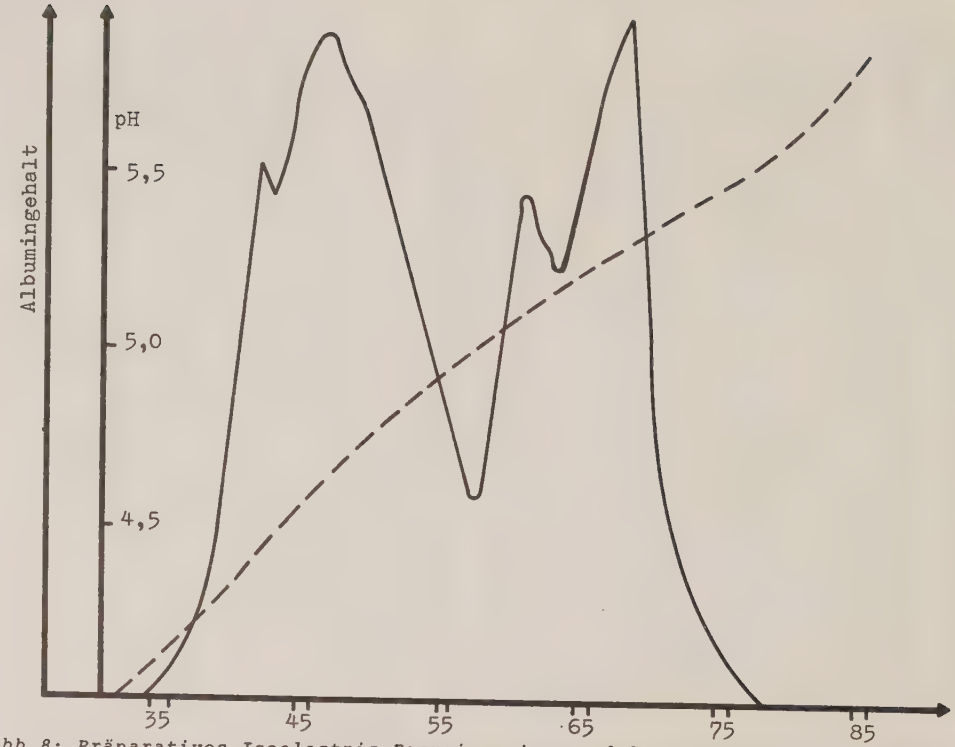


Abb. 8: Präparatives Isoelectric-Focusing eines gelchromatographisch gewonnenen monomeren Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem Saccharose-Gradienten. (Ordinate: pH-Gradient — — — — , Humanalbumingehalt ——— Abszisse: Anzahl der Fraktionen ═══).

4.7. Gelfiltrationsversuche

Die Heterogenität des Albumins wurde in vielen Publikationen durch Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie dargestellt (51, 52, 53, 8o - 84).
Wir hatten die Absicht, die Humanalbuminkonzentrate durch Gelchromatographie auf Polyacrylamidgel-Basis (Biogel P 2oo) auf oligomere Humanalbumine zu untersuchen.
Versuche auf einer kleinen Chromatographiesäule (1,6 x 3o cm) mit den Bedingungen

V_o = 6o ml

V_t = 12. Fraktion

Eluatpuffer: o,5 mol-NaCl

Auftragsmenge: o,3 ml Albumin (5o mg Protein/ml)

Durchflußgeschwindigkeit: o,1 ml/min.

Fraktionsvolumen: 1 ml

zeigten folgendes Ergebnis (Abb.9):

Der Kurvenverlauf für alle untersuchten Albuminkonzentrate war fast identisch, außer Probe 5, die einen Kurvenverlauf wie ein Plasma zeigte. Das erste Albumin trat 1-2 Fraktionen nach dem Ausschlußvolumen V_t auf. Das Maximum lag um Fraktion 21 und enthielt monomeres Albumin. Die Fraktionen zwischen V_t und Fraktion 21

enthielten monomeres und dimeres Albumin. Höhere oligomere Albumine konnten auch durch Ankonzentrieren nicht gefunden werden.

Wurde der Quotient $\frac{C}{C_M} = \frac{\text{Konz. d. Fraktion}}{\text{Konz. Fraktionsmaximum}}$ gegen die dazugehörende Fraktion aufgetragen (Abb.1o), so ergab sich um Fraktion 18, welches einer Molekularmasse von ca. 1oo.ooo Daltons entspricht, ein Abweichen von der Geraden in einen Kurvenverlauf. In diesem Kurvenabschnitt wurde dimeres Humanalbumin gefunden. Nach TRACEY und WINZOR (85) spricht dieses Kurvenverhalten für eine Heterogenität eines Proteins. Dieser Kurvenverlauf war bei allen Proben etwa gleich und ließ daher keine genauen Rückschlüsse auf den quantitativen dimeren Albuminanteil zu.

Bei den Albuminkonzentraten 1, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 13a, 14, 18, 19 und 21 wurde in höheren Eluationsvolumen ein optisches Signal bei 28o nm zwischen den Fraktionen 39 und 58 gefunden. Proteine konnten in diesem Intervall nicht nachgewiesen werden. Sehr geringe Mengen von aromatischen Aminosäuren wurden gefunden.

Um die Separation zwischen monomerem und dimerem Albumin zu verbessern, wurden die Versuche auf einer längeren Säule (2,6 x 1oo cm) durchgeführt:

V_o = 52o ml

V_t = 22. Fraktion

Eluatpuffer: o,5 mol-NaCl

Auftragsmenge: 1,o ml Albumin (5o mg Protein/ml)

Durchflußgeschwindigkeit: o,6 ml/min.

Fraktionsvolumen: 6 ml

Wie die Abb.11 zeigt, entstehen zwei Peaks.

Der 1. Peak mit den Fraktionen 24-28 (Molekularmassentrennung von 17o.ooo bis 11o.ooo Daltons) enthält dimeres Albumin. Der 2. Peak mit einem Maximum bei Fraktion 33 enthält monomeres Albumin. Durch Ankonzentrieren konnten ebenfalls keine höheren oligomeren Albumine gefunden werden. Ebenfalls zeigte sich, wie bei den oben aufgeführten Proben, am Ende der Chromatographie ein 3. Peak (zwischen der 8o. und 95. Fraktion).

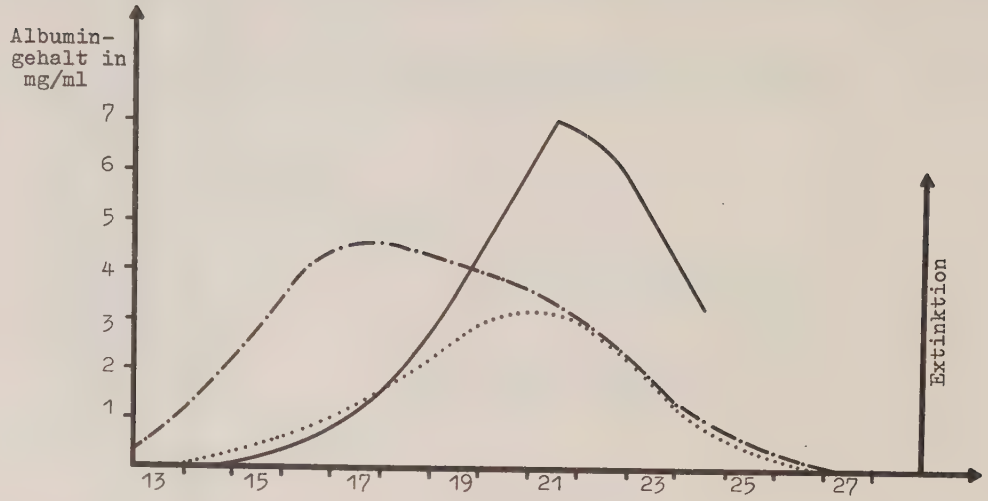


Abb.9: Molekularsiebfiltration eines Humanalbuminkonzentrats und eines menschlichen Normalplasmas.
Laufmittel: o,5 molarer Kochsalz-Puffer, Biogel P 2oo.
(Ordinate: Humanalbumingehalt in mg/ml———— , Extinktion bei 28o nm:·
Albuminkonzentrat…… , Extinktion bei 28o nm: Normalplasma—·—·—·—·,
Abszisse: Zahl der Fraktionen ———).

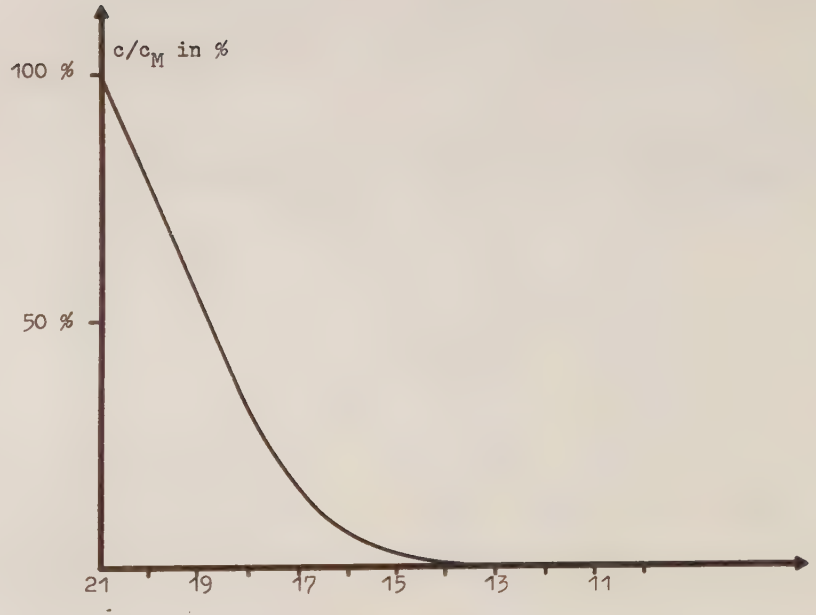


Abb.1o: Diffusionsprofil eines Humanalbumins aus einem Humanalbuminkonzentrat in einem o,5 molaren Kochsalz-Puffer, Biogel P 2oo.
(Ordinate: c/c$_M$ in % ——————, Abszisse: Anzahl der Fraktionen ┌─┬─┬─┐).

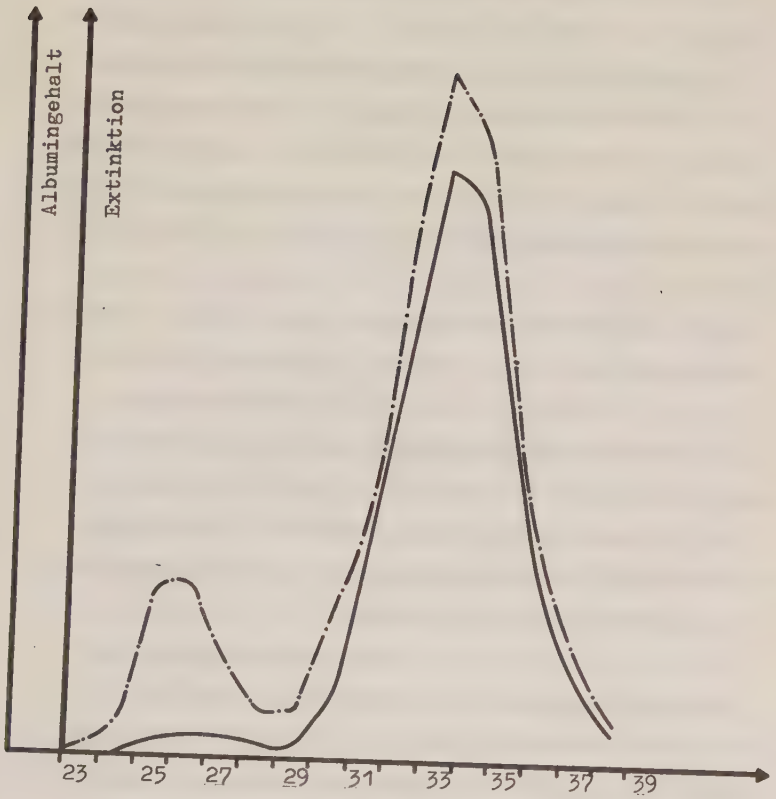


Abb.11: Molekularsiebfiltration eines Humanalbuminkonzentrats.
Laufmittel: o,5 molarer Kochsalz-Puffer, Biogel P 2oo.
(Ordinate: Humanalbumingehalt ————— ,
Extinktion bei 28o nm —·—·— ,
Abszisse: Anzahl der Fraktionen).

5. DISKUSSION

Bei der Herstellung von Albuminkonzentraten müssen diesen zur Lösung des Albumins, zur pH-Einstellung und zur Stabilisierung Salze und Säuren zugesetzt werden. Da es sich meist um natriumhaltige Verbindungen handelt, kommt dem Natriumgehalt der Albuminkonzentrate eine besondere Bedeutung zu, da bei einigen Indikationsstellungen zur Albumintherapie hohe Natriumzufuhren nicht angezeigt sind.

Die 5% Albuminkonzentrate wiesen einen Natriumgehalt von 44 bis 158 mmol/l auf. Bei den 2o% Albuminkonzentraten lag der Natriumgehalt zwischen 8o und 2o6 mmol/l. Hinsichtlich des Kaliumgehaltes waren alle Albuminkonzentrate stark kaliumverarmt mit Werten zwischen o,7 und 1,2 mmol/l. Bei größerer Zufuhr von Albuminkonzentraten darf der geringe Kaliumgehalt dieser Konzentrate nicht unberücksichtigt bleiben.

Die 5% Albuminkonzentrate wiesen im Durchschnitt eine starke Calciumverarmung von o,4 bis 1,6 mmol/l auf. Hingegen lagen bei den meisten 2o% Albuminkonzentraten normale Serumcalciumwerte vor. Dies mag in der Affinität zwischen Calcium und Albumin begründet sein (s. 1.6.). Diese Calciumaffinität und die geringe Calciumkonzen-

tration der 5% Albuminkonzentrate muß bei der Zufuhr größerer Mengen Albuminkonzentrat berücksichtigt werden, um den Gehalt an ionisiertem Calcium im Patienten nicht zu senken.

Unter den Anionen konnten wir nur den Chloridgehalt bestimmen. Die 5% Albuminkonzentrate wiesen einen Chloridgehalt von 12 bis 137 mmol/l auf. Von den zwölf 2o% Albuminkonzentraten wiesen drei Proben kein Chlorid auf, die übrigen Proben zeigten einen Chloridgehalt von 15 bis 175 mmol/l. Der Chloridgehalt ist wahrscheinlich nur abhängig von der zugefügten Menge Natriumchlorid, da stöchiometrisch der Chloridgehalt bei allen Proben unter dem Natriumgehalt lag.

Weitere Anionen sind Hydrogenkarbonat (aus Natriumhydrogenkarbonat zur pH-Einstellung) und Caprylat und Acetyltryptophanat (aus Natriumcaprylat und Natriumacetyltryptophanat zur Albuminstabilisierung). In den Gebrauchsinformationen der Hersteller wird der Natriumcaprylat- und der Natriumacetyltryptophanatgehalt mit je 4 bis 5 mmol/l bei den 5% Albuminkonzentraten, bei den 2o% Albuminkonzentraten mit je 16 bis 2o mmol/l angegeben. Welcher Anteil an Unverträglichkeitsreaktionen diesen Stabilisatoren zuzuschreiben ist, ist ungeklärt. Jedoch sind Unverträglichkeitsreaktionen bei Vorliegen von Caprylatantikörpern nachgewiesen worden (86).

Einige Hersteller lösen ihre Albuminkonzentrate nicht nur in physiologischer Natriumchloridlösung, sondern in einer Natriumchlorid/Glukoselösung, um salzarme, natriumarme Albuminkonzentrate zu erhalten. Glukose wird zugesetzt zur Gewährleistung der Isotonie in den Albuminkonzentraten. So geben GÄNSHIRT und WALKER (87) für die glukosehaltigen 5% Albuminkonzentrate Natriumwerte von ≤32,5 mmol/l an und für die glukosefreien 5% Albuminkonzentrate einen Natriumwert von ≤155 mmol/l. Die glukosefreien bzw. salzarmen 2o% Albuminkonzentrate sollen einen Wert von ≤13o mmol/l aufweisen.
Wir fanden bei den 5% Albuminkonzentraten vier Proben mit einem Glukosezusatz. Probe 4 und 6 zeigten einen Glukosegehalt von 25o bzw. 145 mmol/l, Natriumwerte von 44 bzw. 69 mmol/l und Chloridwerte von 2o bzw. 12 mmol/l. Die Proben 5 und 7 wiesen einen Glukosegehalt von 3o bzw. 41 mmol/l, einen Natriumgehalt von 114 bzw. 137 mmol/l und einen Chloridgehalt von 1o9 bzw. 122 mmol/l auf. Die Proben 5 und 7 dürfen wegen des hohen Natriumgehaltes trotz Glukosezusatz nicht als salzarm deklariert werden. Auch die Proben 4 und 6 dürfen nur im weiteren Sinne als salzarm eingestuft werden.
Die glukosefreien 5% Albuminkonzentrate wiesen Natriumwerte von 122 bis 158 mmol/l auf und erfüllen den

Natriumgehalt für glukosefreie und salzarme Albuminkonzentrate. Bei den 2o% Albuminkonzentraten erhielten drei Proben einen Glukosezusatz von 23 bis 25 mmol/l. Diese Proben konnten mit Natriumwerten von 177 bis 2o6 mmol/l gerade nicht als salzarm bezeichnet werden. Der Natriumgehalt in den glukosefreien 2o% Albuminkonzentraten lag dagegen zwischen 8o und 134 mmol/l, sie sind daher als salzarm zu deklarieren.
Aufgrund der nicht hohen Natriumwerte in den glukosefreien 5% Albuminkonzentraten liegen ihre Osmolaritäten zwischen 22o und 315 mOsmol/l. Selbst die glukosehaltigen 5% Albuminkonzentrate 5, 6 und 7 wiesen noch eine normale Serumosmolarität auf. Hingegen zeigte die Probe 4 mit einem Glukosegehalt von 25o mmol/l eine Hyperosmolarität von 35o mOsmol/l. Die salzarmen und glukosefreien 2o% Albuminkonzentrate zeigten Osmolaritätswerte von 15o bis 29o mOsmol/l. Die salz- und glukosehaltigen 2o% Albuminkonzentrate wiesen dagegen Osmolaritätswerte von 4oo bis 5oo mOsmol/l auf.
Bei ihren Untersuchungen fanden GÄNSHIRT und WALKER (87), daß die glukosehaltigen 5% Albuminkonzentrate eine schwache, die 2o% Albuminkonzentrate eine starke Hämolyse aufwiesen. Bei den glukosefreien 5% Albuminkonzentraten zeigte sich eine Hämolyse nicht. Weiter fanden sie, daß bei 5%

Albuminkonzentraten mit 5% Glukose eine Hämolyse nicht auftrat, wenn der Natriumgehalt weit über 32,5 mmol/l lag.

Wir konnten nun bestätigen, daß die glukosefreien 5% Humanalbuminkonzentrate keine Hämolyse zeigten. Die 5% Albuminkonzentrate mit einem Glukosegehalt von 3o bzw. 41 mmol/l und einem Natriumgehalt von 114 bzw. 137 mmol/l zeigten ebenfalls keine Hämolyse. Jedoch die 5% Albuminkonzentrate mit einem Glukosegehalt von 25o bzw. 145 mmol/l und einem Natriumgehalt von nur 44 bzw. 69 mmol/l hämolysierten Erythrozyten. Die starke hämolysierende Wirkung der 2o% Albuminkonzentrate konnten wir bei unseren untersuchten Proben nicht nachweisen. Dies ist wahrscheinlich bei den salzarmen und den glukosefreien 2o% Albuminkonzentraten dadurch bedingt, daß die Albuminkonzentrate keinen Natriumgehalt aufwiesen, bei dem eine Hämolyse eintritt (Hämolyt. Resistenz 55 - 82 mmol/l NaCl bzw. 11o - 165 mOsmol/l).

Obwohl in den Gebrauchsinformationen zu den Albuminkonzentraten immer erwähnt wird, daß mit Natriumhydrogenkarbonat und Natriumhydroxid auf annähernd neutrale pH-Werte die Albuminkonzentrate eingestellt wurden, fanden wir bei den 5% Albuminkonzentraten einen pH-Bereich von 6,58 bis 7,o2 und bei den 2o% Albuminkon-

zentraten einen pH-Bereich von 6,34 bis 7,o3.
Auf der einen Seite ist bei einem pH von 6,8 die Albumindenaturierungsrate am geringsten (88), auf der anderen Seite muß beachtet werden, daß dem Patienten, der meist sowieso schon eine acidotische Stoffwechsellage aufweist, durch die Albuminkonzentrate mehr oder weniger Säure zugeführt wird.
Um eine Aussage über die Reinheit der Albuminkonzentrate zu treffen, bestimmten wir in den Proben die Gesamtproteinkonzentration mit der Biuretmethode, den Albumingehalt mit der Elektroimmundiffusion und mit der Bromcresolgrünmethode.
Die 5% Albuminkonzentrate wiesen einen Gesamtproteingehalt von 54,9 bis 61,8 g/l mit einem Mittelwert von 58,2 g/l auf. Der absolute Albumingehalt lag zwischen 49,7 und 54,4 g/l mit einem Mittelwert bei 52,6 g/l für die Elektroimmundiffusion. Der relative Albumingehalt lag zwischen 9o und 94% mit einem Mittelwert von 9o,4%.
Die 2o% Albuminkonzentrate wiesen einen Gesamtproteingehalt von 2o8,2 bis 23o,2 g/l mit einem Mittelwert von 215,9 g/l auf. Der absolute Albumingehalt lag zwischen 194,6 g/l und 216,3 g/l mit einem Mittelwert bei 2o5,6 g/l für die Elektroimmundiffusion.

Der relative Albumingehalt lag zwischen 92 und 1oo% mit einem Mittelwert von 95%.
Es zeigte sich, daß die 5% Albuminkonzentrate, bezogen auf eine Konzentration von 5o g/l als 1oo%, im Durchschnitt 16,4% mehr Protein aufwiesen. Die 2o% Proben wiesen im Durchschnitt 8% mehr Protein auf. Alle Humanalbuminkonzentrate zeigten einen absoluten Albumingehalt von größer 5o bzw. 2oo g/l. Jedoch lag der relative Albumingehalt trotz des höheren Gesamtproteingehaltes der 5% Proben im Mittel bei 9o,4%, bei den 2o% Albuminkonzentraten jedoch bei 95%.
Nachdem wir den Albumingehalt zunächst mit der Elektroimmundiffusionmethode bestimmt hatten, versuchten wir eine zeit- und kostensparendere quantitative Albuminbestimmung zu finden. Als Alternative kam die Bromcresolgrünmethode in Betracht. Wurde der Albumingehalt in den als Albuminkonzentrate deklarierten Proben untersucht, so zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen der Elektroimmundiffusion- und der Bromcresolgrünmethode. Waren neben dem Albumin noch größere Mengen anderer Proteine vorhanden, wie z.B. bei den PPL-Konzentraten Probe 1 und 5, so zeigte die Bromcresolgrünmethode mehr Albumin an als die Elektroimmundiffusionmethode.

Es zeigte sich aber, daß zur schnellen quantitativen Albuminbestimmung in Albuminkonzentraten die Bromcresolgrünmethode gut geeignet war.
Leider konnten wir zur Frage des onkotischen Druckes in den Albuminkonzentraten keine Stellung nehmen.
In den Gebrauchsinformationen der Albuminkonzentrate wird immer auf das Fehlen von Antikörpern und Isoagglutininen hingewiesen. Wir konnten in den Albuminkonzentraten IgG, IgA oder IgM immunologisch nicht nachweisen. Auch wurde in den Albuminkonzentraten immunologisch kein AT-III, Plasminogen, Prothrombin oder Fibrinogen gefunden. Die Faktoren C_3c und C_4 des Komplementsystems wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. In der Literatur wird z.B. die schwierige Entfernung von Hämatin in den Albuminpräparaten erwähnt (28). Wir fanden nur einige kontaminierende Proteine, die die Herstellung und die 1o-stündige Erhitzung auf 6o^{o}C ohne weiteres überstanden hatten und in fast allen Proben in geringer Konzentration vorhanden waren. Als kontaminierende Proteine wurden die Transportproteine Transferrin, Haptoglobin und Haemopexin und der Proteinase-Inhibitor alpha-1-Antitrypsin gefunden. Diese Proteine weisen Molmassen zwischen 54.ooo und 1oo.ooo auf und tragen damit auch zum kolloidosmotischen Druck bei.

In den 5% Albuminkonzentraten war das alpha-1-Antitrypsin nur fakultativ in geringsten Konzentrationen vorhanden, in den 2o% Proben wurde es stets nachgewiesen. Haemopexin war in allen Proben fakultativ nur in geringsten Mengen vorhanden. Transferrin und Haptoglobin waren häufiger bei den 5% Albuminkonzentraten nachzuweisen als bei den 2o% Proben, jedoch wiesen die letzteren die höchsten Transferrin- und Haptoglobinwerte auf.

Wie bereits unter dem Abschnitt "Heterogenität" erwähnt und in der Literatur oft beschrieben, können Albumindimere und Albuminoligomere in Albuminkonzentraten entstehen. In der Nuklearmedizin werden Albuminpolymere mit einem Durchmesser von 16 bis 44 um radioaktiv mit Tc 99 m markiert und z.B. zur Darstellung der Lunge verwendet. Bei dieser diagnostischen Maßnahme embolisieren die radioaktiv markierten Albuminpolymere nur in einen kleinen Teil der Lungenkapillaren, treten jedoch diese Albuminpolymere in zur Therapie verwendeten Albuminkonzentraten auf, können bei großem Infusionsvolumen fatale Folgen für den Patienten entstehen.

Um die eventuell vorhandenen Albuminpolymere zu finden, führten wir Gelchromatographieversuche durch.

Wie die Abb.9 zeigt, liegt das Ausschlußvolumen V_t um 2.000.000 Daltons bei der 12. Fraktion. Albumin wurde aber erst ab der 14. Fraktion gefunden. Ebenfalls liegen die Extinktionen für Normalplasma in den Fraktionen wesentlich höher als die Extinktionen der Albuminkonzentrate. Wir schließen daraus, daß

1. in den Albuminkonzentraten keine größeren Proteine auftraten als im Normalplasma und daß
2. die Molmassen der Proteine in den Albuminkonzentraten unter 2.000.000 liegen müssen.

Die Gefahr, daß Albuminpolymere in Albuminkonzentraten enthalten sein könnten, welche die Lungenkapillaren embolisieren könnten, war damit bei den von uns untersuchten Albuminkonzentraten nicht gegeben. In dem ansteigenden Kurvenverlauf der Gelchromatographie, also in dem zuerst auftretenden Eluationsvolumen, fanden wir mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese nur dimeres Albumin. Die Steilheit dieses Kurvenabschnitts, errechnet nach TRACY und WINZOR (85), ließ keine Rückschlüsse auf den quantitativen dimeren Albuminanteil zu. Außerdem war bei allen Proben der Kurvenverlauf sehr ähnlich.

Um eine bessere Separation des dimeren vom monomeren Albumin zu erhalten, führten wir die Gelchromatographie-

versuche auf einer längeren Säule durch. Auch hier zeigte sich, daß Albumin erst nach dem Ausschlußvolumen V_t auftrat (Abb.11). Die Separation gelang auf dieser Säule besser, jedoch konnten wir auch hier nur dimeres Albumin im 1. Peak mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese nachweisen.
Wie bereits erwähnt, wiesen einige Albuminkonzentrate in höheren Eluationsvolumen ein optisches Signal bei 28o nm auf. Eine Erklärung dafür konnten wir nicht finden. Zur besseren Darstellung des Molmassenbereichs zwischen dem des dimeren Albumins und der Molmasse 2.ooo.ooo trennten wir die Albuminkonzentrate in der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese auf und bestimmten die Albuminbanden mit der Laying-On-Methode. In der Literatur ist die Darstellung der Albuminoligomere mittels der Stärkegel- und Polyacrylamidgel-Elektrophorese oft beschrieben worden (89, 9o). Wir fanden nun,im Gegensatz zu den in der Literatur bei Gelchromatographieversuchen gefundenen Albuminoligomeren mit gerader und ungerader Zahl, nur Albuminoligomere mit gerader Zahl. Dies deckt sich jedoch bis zu den quartären Albuminoligomeren mit den Befunden von SCHULZE und HEREMANS (57), die eine Progression nach der Formel 2^o, 2^1, 2^2, ... 2^n angeben.

Es fanden sich bei den Proben 7, 8, 15, 16 und 17 fast nur monomeres und dimeres Albumin. Bei den anderen Proben konnten wir mehr oder weniger breite Banden oligomerer Albumine mit der Laying-On-Methode nachweisen. An der Anode wurde ein Albumin mit einer Molmasse von 38.ooo Daltons gefunden. Dieses Albuminspaltprodukt könnte entweder während der Herstellung der Albuminkonzentrate oder durch in den Proben enthaltene Proteasen entstanden sein.

Eine Quantifizierung der Albuminoligomere mit der Laying-On-Methode konnte, wie oben beschrieben, nicht vorgenommen werden, da der Peak des monomeren Albumins zu groß und die Peaks der oligomeren Albumine zu gering waren.

Die oligomeren Albumine entstehen nicht nur durch die Prozedur der Herstellung der Albuminkonzentrate, sondern auch durch Lagerung und Temperaturerhöhung (55, 9o, 91). Ein hoher Albumingehalt in den Albuminkonzentraten scheint das monomere Albuminmolekül vor Reaktionen zum oligomeren Albumin zu schützen, da die Peaks des dimeren Albumins bei den 2o% Albuminkonzentraten mit der Laying-On-Methode kleiner waren als die Peaks der 5% Albuminkonzentrate.

Die isoelektrische Heterogenität des Albumins ist in den letzten Jahren Darstellung zahlreicher Publikationen gewesen (77, 78, 79, 92, 93). Die Erklärungen für die bei der isoelektrischen Trennung beobachteten Komponenten gehen von der Denaturierung des Albumins (77, 93), durch die Herstellung bedingt, über Funktionszustände des Albumins, bedingt durch Beladung mit Anionen, z.B. Fettsäuren (79), bis zu Unterschieden in der Primärstruktur des Albuminmoleküls.
Uns interessierte die Frage, ob über die Bestimmung der isoelektrischen Punkte mit der analytischen Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik Rückschlüsse auf denaturiertes Albumin gemacht werden könnten. SALMAN und WILLIAMSON (77) denaturierten Rinderalbumin mit 6-molarem Harnstoff und wiesen danach eine Änderung der isoelektrischen Heterogenität von pI 4,78 - 4,86 auf pI 5,86 - 6,01 nach und definierten diesen Bereich als denaturiertes Albumin. CARLSSON und PERLMANN (93) trennten Humanalbumin aus Albuminkonzentraten mit dem präparativen Isoelectric-Focusing auf und sahen die Albuminkomponenten zwischen den pI 4,5 und 4,9 als denaturiertes Albumin an. Da der isoelektrische Punkt des denaturierten Albumins nicht genau definiert war, verglichen wir gepooltes Frischplasma, die Humanalbumin-

konzentrate und lyophilisiertes Humanalbumin reinst, unter der Annahme, daß es sich beim Frischplasma um relatives natives Albumin und beim lyophilisierten Albumin um relativ denaturiertes Albumin handele (94). Die Trennung aller Albuminpräparate ergab zwei Albuminintervalle. Das anodennahe Intervall erstreckte sich von pH 4,4 bis 5,o5, das kathodennahe von pH 5,3 bis 5,45. Da zwischen den einzelnen Präparaten keine Unterschiede bestanden und oberhalb von pH 6 kein Albumin vorhanden war, konnten wir mit dieser Methode keinen Hinweis für eine Denaturierung finden.
Bei der präparativen Isoelectric-Focusing-Technik fanden wir, daß der Saccharose- und Glyzerin-Gradient in den gemessenen isoelektrischen Punkten und im Albumingehalt der Fraktionen gut übereinstimmte. Beim Äthylenglykol-Gradienten entstand ein massiver Peak mit 2 angedeuteten Peaks. Beim Glyzerin- und Äthylenglykol-Gradienten fanden wir oberhalb von pH 6 Albumin. Mit der Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik fanden wir in dem Bereich pH 3,5 bis 9,5 oberhalb von pH 6 kein Albumin. Es handelte sich dabei wahrscheinlich nicht um ein Albumindenaturierungsprodukt, sondern um Albumin, das, bedingt durch die Gradienten, an der Glaswand haften blieb und in höheren Eluationsvolumen ausgewaschen wurde.

Neben dem Einfluß der Gradienten auf die isoelektrische Heterogenität wurde der Einfluß des Ampholyten untersucht. Eine unterschiedliche Ampholytkonzentration hatte keinen Einfluß auf die Heterogenität, jedoch schien eine "Reinigung" des Ampholyten durch ein "Vor-Isoelectric-Focusing" einen Einfluß auf die isoelektrische Heterogenität von pH 5 zu haben. Ein Splitten in einzelne isoelektrische Punkte war nicht mehr nachweisbar.

Eine weitere Erklärung der isoelektrischen Heterogenität des Albumins könnte durch die Anwesenheit von Albumindimeren und -oligomeren begründet sein. Wir fanden mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese, der Laying-On-Methode und der Gelchromatographie in allen Fraktionen des präparativen Isoelectric-Focusing monomeres und dimeres Albumin, weiter zeigten monomeres und dimeres Albumin mit der präparativen Isoelectric-Focusing-Technik eine Heterogenität (Abb.8).

Eine Begründung der isoelektrischen Heterogenität des Albumins können wir aufgrund der vielen Faktoren, die die Heterogenität beeinflussen, nicht geben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Die 5% Albuminkonzentrate waren kalium- und chloridarm, mit niedrigen bis normalen Chloridwerten. Die glukosehaltigen 5% Albuminkonzentrate enthielten Natriumwerte von größer 32,5 mmol/l und konnten daher nicht als salzarm bezeichnet werden. Außerdem zeigten die glukosehaltigen 5% Albuminkonzentrate mit geringen Natriumwerten eine hämolysierende Wirkung. Die glukosefreien 5% Albuminkonzentrate lagen mit ihren Natriumwerten unter oder um 155 mmol/l. Die 5% Albuminkonzentrate wiesen Osmolaritäten von 22o bis 35o mOsmol/l und einen pH-Wert von 6,58 bis 7,o2 auf.

6.2. Die 2o% Albuminkonzentrate waren kaliumarm, mit überwiegend normalen Calciumwerten, mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen. Die glukosehaltigen 2o% Albuminkonzentrate wiesen Natriumkonzentrationen von größer 13o mmol/l auf und durften daher nicht als salzarm bezeichnet werden. Die glukosefreien 2o% Albuminkonzentrate hatten Natriumwerte von kleiner 13o mmol/l und durften als salzarme Konzentrate deklariert werden. Die glukosehaltigen 2o% Albuminkonzentrate zeigten Osmolaritäten von 4oo bis 5oo mOsmol/l, die glukosefreien von 19o bis 29o mOsmol/l.

Eine hämolysierende Wirkung zeigten die 2o% Albuminkonzentrate nicht. Der pH-Wert schwankte zwischen 6,34 und 7,o3.

6.3. Die 5% Albuminkonzentrate wiesen einen Gesamteiweißgehalt von 54,9 bis 61,8 g/l, mit einem absoluten bzw. relativen Albumingehalt von 49,7 bis 54,4 g/l bzw. 9o bis 94%, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, auf. Die 2o% Albuminkonzentrate wiesen einen Gesamteiweißgehalt von 2o8,2 bis 23o,2 g/l, mit einem absoluten bzw. relativen Albumingehalt von 194,6 bis 216,3 g/l bzw. 92 bis 1oo%, gemessen mit der Elektroimmundiffusion, auf. Der mittlere Gesamtproteingehalt bei den 5% Albuminkonzentraten betrug 58,2 g/l mit einem mittleren relativen Albumingehalt von 9o,4%.
Der mittlere Gesamtproteingehalt bei den 2o% Albuminkonzentraten betrug 215,9 g/l mit einem mittleren relativen Albumingehalt von 95%.

6.4. Eine alternative quantitative Albuminbestimmungsmethode in Albuminkonzentraten zur Elektroimmundiffusion ist die Bromcresolgrünmethode.

6.5. Die Albuminkonzentrate waren nicht kontaminiert mit Immunglobulinen, C_3c, C_4, alpha-2-Makroglobulin, Fibrinogen, AT-III, Plasminogen und Prothrombin. Eine geringe Kontamination bestand mit den Proteinen Transferrin, Haptoglobin, Haemopexin und alpha-1-Antitrypsin, die Molmassen von 54.ooo bis 1oo.ooo aufweisen.

6.6. Gelchromatographisch konnten monomeres und dimeres Albumin getrennt und immunologisch bestimmt werden. Ein Nachweis von Albuminoligomeren gelang nicht, jedoch enthielten die Albuminkonzentrate, nach den Ergebnissen der Gelchromatographie, keine Proteine mit Molmassen über 2.ooo.ooo Daltons. In einigen Albuminkonzentraten trat in höheren Eluationsvolumen bei 28o nm ein optisches Signal auf. Es konnte jedoch in diesem Bereich kein Protein nachgewiesen werden.

6.7. Mit der Polyacrylamid-Gradienten-Elektrophorese gelang der Nachweis von Albuminoligomeren.

6.8. Mit der Laying-On-Methode gelang

1. die Identifizierung der elektrophoretisch aufgetrennten Albuminoligomere und eines Albuminfragmentes von etwa 38.ooo Daltons,

2. der Nachweis von geringsten Albuminoligomer-konzentrationen.

6.9. Mit der Dünnschicht-Isoelectric-Focusing-Technik wiesen wir die isoelektrische Heterogenität des Albumins nach. Das anodennahe Intervall von pH 4,4 bis 5,o5 enthielt mehrere Albuminpeaks, hingegen wies das kathodennahe Intervall nur eine Albuminbande von pH 5,3o bis 5,45 auf. Da wir sowohl bei gepooltem Frischplasma als auch bei lyophilisiertem Humanalbumin reinst kein anderes Verhalten fanden, können wir die isoelektrische Heterogenität nicht als den Beweis für eine Denaturierung ansehen.

6.1o. Mit der präparativen Isoelectric-Focusing-Technik stellten wir die Abhängigkeit der isoelektrischen Heterogenität vom Gradienten (Saccharose, Glyzerin, Äthylenglykol) und von einer "isoelektrischen Vorreinigung" des Ampholyten dar. Die Ampholytkonzentration wies keinen Einfluß auf die isoelektrische Heterogenität auf. Gelchromatisch gewonnenes monomeres und dimeres Albumin wies die gleiche isoelektrische Heterogenität auf.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) HÄSSIG,A.; S.BARANDUN; U.BUCHER; P.LUNDSGAARD-HANSEN
Hämotherapie nach Maß.
Dtsch.Med.Wschr. 99 (1974) 913 und 962

2) HÄSSIG,A.
Hämotherapie mit Plasmafraktionen.
Triangel 5 (1962) 238

3) COHN,E.J.; L.E.STRONG; W.L.HUGHES,Jr.; D.J.MULFORD; J.N.ASHWORTH; M.BELIN; H.L.TAYLOR
Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids.
J.Amer.Chem.Soc. 68 (1946) 459

4) NITSCHMANN,Hs.; P.KISTLER; W.LERGIER
Vereinfachtes Verfahren zur Gewinnung von humanem Albumin und -Globulin aus Blutplasma mittels Alkoholfällung.
Helvet.chim.acta 37 (1954) 866

5) KISTLER,P.; Hs.NITSCHMANN
Large Scale Production of Human Plasma Fractions.
Vox Sang. 7 (1962) 414

6) HINK,J.H.,Jr.; J.HIDALGO; V.P.SEEBERG; F.F.JOHNSON
Preparation and Properties of a Heat-Treated Human Plasma Protein Fraction.
Vox Sang. 2 (1957) 174

7) NITSCHMANN,Hs.; P.KISTLER; H.R.REHFER; A.HÄSSIG; A.JOSS
A Heat Stable Human Plasma Protein Solution obtained by Desalting (PPL).
Vox Sang. 1 (1956) 183

8) TAYLOR,H.L.; F.C.BLOOM; K.B.McCALL; L.A.HYNDMAN
An Improved Procedure for the Preparation of Human Serum Albumin from Placental Extracts.
J.Amer.Chem.Soc. 78 (1956) 1353

9) COHN,E.J.; F.R.N.GURD; D.M.SURGENOR; B.A.BARNES; R.K.BROWN; G.DEROUAUX; J.M.GILLESPIE; F.W.KAHNT; W.F.LEVER; C.H.LIU; D.MITTELMAN; R.F.MOUTON; K.SCHMID; E.UROMA
A System for the Separation of the Components of Human Blood: Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma.
J.Amer.Chem.Soc. 72 (195o) 465

1o) MULFORD,D.J.; E.H.MEALEY; L.D.WELTON
Preparation of a Stable Human Plasma Protein Solution.
J.Clin.Invest. 34 (1955) 983

11) CURLING,J.M.; J.H.BERGLÖF; L.O.LINDQUIST; S.ERIKSSON
A Chromatographic Procedure for the Purification of Human Plasma Albumin.
Vox Sang. 33 (1977) 97

12) SCHULTZE,H.E.; M.SCHÖNENBERGER; H.D.MATHEKA
Behringwerk-Mitt. 26 (1952) 21

13) REID,A.F.; F.JONES
Fractionation of Blood Plasma Proteins Using Ion Exchange Resins.
Ing.Eng.Chem. 43 (1951) 1o74

14) HOCH,H.; A.CHANUTIN
Albumin from Heated Human Plasma. I. Preparation and Electrophoretic Proterties.
Arch.Biochem.Biophys. 51 (1954) 271

15) MICHAEL,S.E.
The Isolation of Albumin from Blood Serum or Plasma by means of Organic Solvents.
Biochem.J. 82 (1962) 212

16) NITSCHMANN,Hs.; E.RICKLI; P.KISTLER
Fractionation of Human Plasma with Polyphosphate.
Vox Sang. 5 (196o) 232

17) SCHNEIDER,W.; H.LEFEVRE; H.FIEDLER; L.J.McCARTY
An Alternative Method of Large Scale Plasma Fractionation for the Isolation of Serum Albumin.
Blut 3o (1975) 121

18) PETERS,Th.,Jr.
Serum Albumin.
Advan.Clin.Chem. 13 (197o) 37

19) WHITE,W.F.; J.SHIELDS; K.C.ROBBINS
C-Terminal Sequence of Crystalline Bovine and Human Serum Albumin: Relationship of C-Terminus to Antigenic Determinants of Bovine Serum Albumin.
J.Am.Chem.Soc. 77 (1955) 1267

2o) THOMPSON,E.O.P.
The N-Terminal Sequence of Serum Albumins; Observations on the Thiohydantoin Method.
J.Biol.Chem. 2o8 (1954) 565

21) FOSTER,J.F.
In "The Plasma Proteins" (F.W.PUTNAM,ed.)
Academic Press New York Vol. I. (196o) 179

22) SOGAMI,M.; J.F.FOSTER
Isomerization Reactions of Charcoal-Defatted Bovine Plasma Albumin. The N-F Transition and Acid Expansion.
Biochemistry 7 (1968) 2172

23) SCHULTZE,H.E.; G.SCHWICK
Quantitative immunologische Bestimmung von Plasma-proteinen.
Clin.Chim.Acta 4 (1959) 15

24) CHEN,R.F.
Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment.
J.Biol.Chem. 242 (1967) 173

25) HUGHES,W.L.
Interstitial Proteins: The Proteins of Blood Plasma and Lymph. In "The Proteins" (NEURATH,H. and K.BAILEY, eds.)
Academic Press New York Vol. II. (1954) 663

26) COHN,E.J.; W.L.HUGHES,Jr.; J.H.WEARE
Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIII. Crystallization of Serum Albumins form Ethanol-Water Mixtures.
J.Am.Chem.Soc. 69 (1947) 1753

27) MALVANO,R.; U.ROSA; P.GROSSO
Determination of some Trace Elements in Human Serum Albumin by Neutron-Activation-Analysis.
Intern.J.Appl.Radiation Isotopes 18 (1967) 121

28) ROSENFELD,M.; D.M.SURGENOR
Methemalbumin. Interaction between Human Serum Albumin and Ferriprotoporphyrin IX.
J.Biol.Chem. 183 (195o) 663

29) TOVE,S.B.
The Esterolytic Activity of Serum Albumin.
Biochim.Biophys.Acta 57 (1962) 23o

3o) WILSON,W.D.; J.F.FOSTER
Conformation-Dependent Limited Proteolysis of Bovine Plasma Albumin by an Enzyme Present in Commercial Albumin Preparations.
Biochemistry 1o (1971) 1772

31) ANAI,M.; H.HARAGUCHI; Y.TAKAGI
An Endonuclease Associated with Bovine Plasma Albumin Fraction.
J.Biol.Chem. 247 (1972) 193

32) ELSBACH,P.; P.PETTIS
Phospholipase Activity Associated with Serum Albumin.
Biochim.Biophys.Acta 296 (1973) 89

33) HUGHES,W.L.,Jr.
Protein mercaptides.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 14 (195o) 79

34) HUGHES,W.L.; H.M.DINTZIS
Crystallization of the Mercury Dimers of Human and Bovine Mercaptalbumin.
J.Biol.Chem. 239 (1964) 845

35) KATCHALSKI,E.; G.S.BENJAMIN; V.GROSS
The Availability of the Disulfide Bonds of Human and Bovine Serum Albumin and of Bovine -Globulin to Reduction by Thioglycolic Acid.
J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 4o96

36) EDWARDS,F.B.; R.B.ROMBAUER; B.J.CAMPBELL
Thiol Disulfide Interchange Reactions between Serum Albumin and Disulfides.
Biochim.Biophys.Acta 194 (1969) 234

37) ONCLEY,J.L.; G.SCATCHARD; A.BROWN
Physical-Chemical Characteristics of Certain of the Proteins of Normal Human Plasma.
J.Phys.Colloid Chem. 51 (1947) 184

38) ALBERTY,R.A.
Elektrochemical Properties of the Proteins and Amino Acids. In "The Proteins" (NEURATH,H. and K.BAILEY,eds.).
Academic Press New York Vol. I. 1953

39) TANFORD,Ch.
Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins.
XXIII. Hydrogen Ion Equilibria in Native and Modified Human Serum Albumins.
J.Am.Chem.Soc. 72 (195o) 441

4o) COLVIN,J.R.; D.B.SMITH; W.H.COOK
The Microheterogeneity of Proteins.
Chem.Rev. 54 (1954) 687

41) WONG,K.P.; J.F.FOSTER
The Microheterogeneity of Plasma Albumin. VI. Membrane Equilibrium Salting-Out As a Method of Demonstrating Microheterogeneity of Proteins.
Biochemistry 8 (1969) 4o96

42) SIMPSON,R.B.; H.A.SAROFF
Decrease in Sulfhydryl Titer of Serum Albumin.
J.Am.Chem.Soc. 8o (1958) 2129

43) KELLER,S.; R.J.BLOCK
Amino Acid Composition of the Serum Proteins. III. The Chromatographic Isolation of Human and Bovine Serum Albumins, and the Amino Composition of the Fractions.
Arch.Biochem.Biophys. 85 (1959) 366

44) GUTTER,F.J.; E.A.PETERSON; H.A.SOBER
Sedimentation Behavior of Bovine Plasma Albumin as a Function of Urea Concentration and pH.
Arch.Biochem.Biophys. 72 (1957) 194

45) McMENAMY,R.H.; Y.LEE
Microheterogeneity in Albumin: A Contaminant.
Arch.Biochem.Biophys. 122 (1967) 635

46) SAIFER,A.; A.H.ELDER; F.VECSLER
Electrophoretic Mobility-Ionic Strength Studies. IV. The Effect of Lipids on the Electrophoretic Patterns of Human Serum Albumin at Acid pH.
J.Biol.Chem. 235 (196o) 1346

47) SCHMID,K.
Electrophoresis of Human Serum Albumin at pH 4,o. 1. A Systematic Study on the Effect of Organic Acids and Alcohols upon the Electrophoretic Behavior of Albumin.
J.Biol.Chem. 234 (1959) 3163

48) ARVAN,D.A.; B.S.BLUMBERG; L.MELARTIN
Transient "Bisalbuminemia" Induced by Drugs.
Clin.Chim.Acta 22 (1968) 211

49) CANN,J.R.
Effect of Binding of Ions and Other Small Molecules on Protein Structure. VII. The Role of Aliphatic Acid Binding and of Convection in the Electrophoresis of Serum Albumin at Low pH.
J.Biol.Chem. 235 (196o) 281o

5o) TOMBS,M.P.; K.B.COOKE; D.BURSTON; N.F.MACLAGAN
The Chromatography of Normal Serum Proteins.
Biochem.J. 8o (1961) 284

51) HARTLEY,R.W.; E.A.PETERSON; H.A.SOBER
The Relation of Free Sulfhydryl Groups to Chromatographic Heterogeneity and Polymerization of Bovine Plasma Albumin.Beiochemistry 1 (1962) 6o

52) DUPARD,F.; A.ALFSEN; M.F.JAYLE
Etude Des Sous-Fractions De L'Albumine Humaine.
Bull.Soc.Chim.Biol. 49 (1967) 253

53) ANDERSSON,L.
The Heterogeneity of Bovine Serum Albumin.
Biochem.Biophys.Acta 117 (1966) 115

54) SAIFER,A.; J.PALO
Amino Acid Composition of Monomeric and Polymeric Human Serum Albumin.
Anal.Biochem. 27 (1969) 1

55) FINLAYSON,J.S.
Effects of Long-Term Storage on Human Serum Albumin. II. Follow-up of Chromatographycally and Ultracentrifugally Detectable Changes.
J.Clin.Invest. 44 (1965) 1561

56) POULIK,M.D.; W.W.ZUELZER; R.MEYER
Proteins in Normal an Nephrotic Sera with Filter Paper Electrophoretic Mobility of Albumin.
J.Lab.Clin.Med. 57 (1961) 2o7

57) SCHULTZE,H.E.; J.F.HEREMANS
Molecular Biology of Human Proteins.
Amer.Elsevier, New York, 1966

58) CANNON,D.C.; I.OLITZKY; J.A.INKPEN
Proteins. In "Clinical Chemistry. Principles and Technics." (HENRY,R.J.; D.C.CANNON, eds.)
Harper & Row, New York, 1974

59) KATZ,J.
Extravascular Albumin Mass and Exchange in Rat Tissues.
Clin.Sci. 39 (197o) 7o5

6o) DEWEY,W.C.
Vascular-extravascular Exchange of I^{131} Plasma Proteins in the Rat.
Amer.J.Physiol. 197 (1959) 423

61) ROTHSCHILD,M.A.; M.ORATZ; J.MONGELLI; S.S.SCHREIBER
Albumin Metabolism in Rabbits during Gamma Globulin Infusions.
J.Lab.Clin.Med. 66 (1965) 733

62) OWEN,J.A.
Effect of Injury on Plasma Proteins.
Advan.Clin.Chem. 9 (1967) 1

63) ROTHSCHILD,M.A.; M.ORATZ; J.MONGELLI; L.FISHMAN; S.S.SCHREIBER
Amino Acid Regulation of Albumin Synthesis.
J.Nutrition 98 (1969) 395

64) LUNDSGAARD-HANSEN,P.
Der Einsatz von Albumin in der Klinik.
Die gelben Hefte (Behring) XVIII (1978) 8

65) RING,J.; K.MESSMER
Incidence and Severity of Anaphylactoid Reactions to Colloid Volume Substitutes.
Lancet 1 (1977) 466

66) MURRAY,R.; W.C.L.DIEFENBACH; H.GELLER; N.C.LEONE; F.RATNER
The Problem of Reducing the Danger of Serum Hepatits form Blood and Blood Products.
N Y State J. Med. 55 (1955) 1145

67) MANCINI,G.; A.O.CARBONARA; J.F.HEREMANS
Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion.
Immunochemistry 2 (1965) 235

68) LAURELL,C.B.
Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies.
Anal.Biochem. 15 (1966) 45

69) DOUMAS,B.T.; W.A.WATSON; H.G.BIGGS
Albumin Standards and the Measurement of Serum Albumin with Bromcresol Green.
Clinica Chimica 31 (1971) 87

7o) WRIGHT,G.L.; K.B.FARRELL; D.B.ROBERTS
An Evaluation of Gradient acrylamide Gel Electrophoresis and Acrylamide Gel Isoelectric Focusing for the Primary Separation of Complex Mixtures of Proteins: Comparison of One- and Two-Dimensional Analytical Procedures.
Biochim.Biophys.Acta 295 (1973) 396

71) DUNKER,A.K.; RUEKERT,R.R.
Observations on Molecular Weight Determinations on Polyacrylamide Gel.
J.Biol.Chem. 244 (1969) 5o74

72) ESPOSITO,J.; J.F.OBIJESKI
High Resolution Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis.
Prep.Biochem. 6 (1976) 431

73) MARGOLIS,J.; K.G.KENRICK
Electrophoresis on Polyacrylamide Concentration Gradient.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 27 (1967) 68

74) RESSLER,N.
Two-Dimensional Electrophoresis of Protein Antigens with an Antibody Containing Buffer.
Clin.Chim.Acta 5 (196o) 795

75) LAURELL,C.B.
Antigen-Antibodiy Crossed Electrophoresis.
Anal.Biochem. 1o (1965) 358

76) CLARKE,M.H.G.; T.FREEMAN
Quantitative Immunoelectrophoresis of Human Serum Proteins.
Clin.Sci. 35 (1968) 4o3

77) SALAMAN,M.R.; A.R.WILLIAMSON
Isoelectric Focusing of Proteins in the Native and Denatured States. Anomalous Behaviour of Plasma Albumin.
Biochem.J. 122 (1971) 93

78) SPENCER,E.M.; T.P.KING
Isoelectric Heterogeneity of Bovine Plasma Albumin.
J.Biol.Chem. 246 (1971) 2o1

79) VALMET,E.
The Heterogeneity of Human Serum Albumin.
Protides of The Biological Fluids (1969) 443

8o) TISELIUS,A.; S.HJERTEN; Ö.LEVIN
Protein Chromatography on Calcium Phosphate Columns.
Arch.Biochem.Biophys. 65 (1956) 132

81) BOMAN,H.G.; L.E.WESTLUND
Protein Chromatography on an Anion-Exchange Resin.
Arch.Biochem.Biophys. 64 (1956) 217

82) JANATOVA,J.; O.MIKES; J.SPONAR
Heterogeneity of Human Serum Albumin, Preparation Isolation of Components by Gel Filtration and Ion-Exchange Chromatography.
Collection Czech.Chem.Commun. 33 (1968) 788

83) HJERTEN,S.
Calcium Phosphate Chromatography of Normal Human Serum and of Electrophoretically Isolated Serum Proteins.
Biochim.Biophys.Acta 31 (1959) 216

84) SHRIVASTAVA,P.K.; H.GOCH; K.ZAKRZEWSKI
Plurality of Human Serum Albumin.
Biochim.Biophys.Acta 271 (1972) 31o

85) TRACEY,M.V.; D.J.WINZOR
Interpretation of Zonal Asymmetry in Gel Filtration.
Arch.Biochem.Biophys. 117 (1966) 184

86) HOSSAINI,A.A.; A.J.WASSERMAN; G.P.VENNART
Experimental Induction of Caprylatedependent Albumin Antibodies.
Amer.J.Clin.Path. 65 (1976) 513

87) GÄNSHIRT,K.H.; W.H.WALKER
Untersuchungen über in vitro-Mischbarkeit von Erythrozytenkonzentrat mit Infusionslösungen. In "Klinische Anästhesiologie und Intensivmedizin" (AHNEFELD,F.W.; H.BERGMANN; C.BURRI; W.DICK; M.HALMAGYI; F.RÜGHEIMER, eds.).
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977
Band 14

88) GIBBS,R.J.
Albumin from Heated Human Plasma. II. Denaturation Kinetics: Influence of pH and Temperature.
Arch.Biochem.Biophys. 51 (1954) 277

89) RAYMOND,S.; M.NAKAMICHI
Electrophoresis in Synthetic Gels. II. Effect of Gel Concentration.
Analytical Biochemistry 7 (1964) 225

90) SKOOG,B.; B.GRANSTRAND
Quantitative Determination of Albumin Dimer in Albumin Preparations by Combined Starch-Gel Electrophoresis and Immunoprecipitation.
Vox Sang. 32 (1977) 242

91) ALLARY,M.; J.SAINT-BLANCARD
Utilisation Du Caprylate De Sodium Pour Fractionner Les Protéines Plasmatiques.
Ann.Pharm.Franc. 31 (1973) 513

92) REIS,H.E.; O.WETTER
Über die isoelektrische Trennung von Serumalbuminen.
Klin.Wschr. 47 (1969) 426

93) CARLSSON,H.E.; P.PERLMANN
Isoelectric Focusing and Immunological Characterization of Human Serum Albumin.
Protides of the Biological Fluids (1969) 439

94) LAHMANN,N.
Immunologische Untersuchungen an lyophilisiertem Humanplasma.
Folia Haematol., Leipzig 99 (1973) 2/3 259

LEBENSLAUF

Am 26.6.1952 wurde ich als Sohn der Eheleute Johannes und Angela Sondag, geb. Faust, in Völlenerkönigsfehn, Kreis Leer/Ostfriesland, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule absolvierte ich eine dreijährige Lehre als Lacklaborant, die ich im Januar 1971 mit dem Gesellenbrief abschloß. Von 1971 bis 1973 war ich als Lacklaborant tätig.

Das Abendgymnasium der Stadt Duisburg besuchte ich ab 1971 und verließ es im Dezember 1974 mit dem Reifezeugnis.

Im Sommersemester 1975 nahm ich an der Universität Düsseldorf das Studium der Humanmedizin auf. Hier legte ich auch im März 1977 die Ärztliche Vorprüfung, im April 1978 den Ersten Abschnitt und im April 198o den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.